



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DEL NÚCLEO
CELULAR DEL REINO PLANTAE**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

P R E S E N T A

JAIME JIMÉNEZ RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA.
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. OLGA MARGARITA ECHEVERRÍA MARTÍNEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.
DR. ALFONSO TORRE BLANCO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DEL NÚCLEO
CELULAR DEL REINO PLANTAE**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

P R E S E N T A

JAIME JIMÉNEZ RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA.
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. OLGA MARGARITA ECHEVERRÍA MARTÍNEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.
DR. ALFONSO TORRE BLANCO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Al apoyo recibido del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto 180835.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García por dirigir la tesis y por su apoyo incondicional para llevarla a cabo.

A la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez y al Dr. Alfonso Torre Blanco, miembros del comité tutorial, por sus valiosas sugerencias durante el desarrollo de la tesis.

A la Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán, a la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez, a la Dra. Sandra Gómez Arroyo, a la Dra. Guadalupe Trinidad Zavala Padilla, y a la Dra. Lourdes Teresa Agredano Moreno por revisar el manuscrito y por sus valiosas observaciones y contribuciones para mejorarlo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gerardo Hebert Vázquez-Nin del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM por su apoyo en el desarrollo de la tesis.

A las doctoras Lourdes Teresa Agredano Moreno y Guadalupe Trinidad Zavala Padilla, así como a la M. en C. Ernestina Ubaldo Pérez por su invaluable apoyo en el trabajo de laboratorio.

Al Dr. Zenón Cano Santana por la donación del ejemplar de *Schistocerca piceifrons piceifrons*.

Al Dr. Gustavo Montejano Zurita por la donación de los ejemplares de *Nitellopsis*.

ÍNDICE

Resumen.....	5
Abstract.....	6
Introducción.....	7
Justificación.....	15
Objetivos.....	15
Metodología.....	16
Fijación, Post-fijación e Inclusión.....	17
Caracterización del núcleo de Ginkgo biloba.....	17
Resultados.....	19
Ultraestructura del núcleo de Ginkgo biloba.....	19
Tipo de núcleo en los principales grupos del reino Plantae.....	27
Discusión.....	35
A. Ginkgo biloba.....	35
B. Distribución de gránulos de Lacandonia y de núcleo reticulado en el reino Plantae.....	37
C. Algunas ideas sobre la relación entre el contenido de ADN y diversificación de las plantas.....	38
D. ¿El contenido de ADN y la presencia de gránulos de Lacandonia tiene alguna relación con la invasión al medio terrestre?.....	42
Conclusiones.....	48
Literatura citada.....	49
Anexo. Artículo publicado.....	56
Lista de Figuras y Cuadros.....	3
Lista de Abreviaturas.....	4

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

	Pag.
Figura 1 Estructura de la cromatina en los cromosomas metafásicos.	8
Figura 2 Arreglo de la cromatina y contenido de ADN, Nagl (1985).	10
Figura 3 Organización general de un núcleo interfásico de mamífero.	11
Figura 4 Modelo de biogénesis de los ribosomas.	12
Figura 5 Modelo de funcionamiento y localización de los cúmulos de GICs.	14
Figura 6 Núcleo de <i>Ginkgo biloba</i> .	21
Figura 7 Micrografía electrónica de transmisión de alta resolución de núcleo de <i>Ginkgo biloba</i> .	22
Figura 8 Inmunolocalización ultraestructural de ADN de <i>Ginkgo biloba</i> . vista en microscopio electrónico de transmisión.	23
Figura 9 Localización de ARN a través de hibridación ultraestructural <i>in situ</i> en el núcleo de <i>Ginkgo biloba</i> .	24
Figura 10 Núcleo de <i>Ginkgo biloba</i> utilizando contraste de acetato de uranilo-citrato de plomo en microscopio electrónico de transmisión.	25
Figura 11 Localización de ARN en gránulos de <i>Lacandonia</i> en el núcleo de <i>Ginkgo biloba</i> .	26
Figura 12 Microfotografías de núcleos interfásicos teñidos con azul de toluidina obtenidas en microscopio óptico.	28
Figura 13 Microfotografías obtenidas en el microscopio electrónico de transmisión.	29
Figura 14 Cladograma de los taxa estudiados.	33
Figura 15 Distribución de frecuencias de los tamaños de deleción en <i>Podisma</i> , <i>Italpodisma</i> , <i>Laupala</i> y <i>Drosophila melanogaster</i> .	42
Figura 16 Microfotografía de núcleo de <i>Ambystoma rivulare</i> , obtenida en microscopio electrónico de transmisión.	44
Figura 17 Microfotografía de núcleo de <i>Ambystoma rivulare</i> , obtenida en microscopio electrónico de transmisión.	45

Figura 18	Núcleos de <i>Schistocerca piceifrons piceifrons</i> teñidos con DAPI.	47
Tabla 1	Tipo de núcleo de acuerdo al arreglo de la cromatina y la presencia o ausencia de gránulos de <i>Lacandonia</i> (GLs) en los organismos estudiados.	31

LISTA DE ABREVIATURAS

BRS	Anillos de Balbiani
C	Número haploide de cromosomas
poli (A)+ARN	Cadena larga de nucleótidos de adenina unida al mARN
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-ácetico
FPCs	Fibras pericromatinianas
GBs	Gránulos de Balbiani
GICs	Gránulos intercromatianos
GLs	Gránulos de Lacandonia
GPCs	Gránulos pericromatianos
HnRNPs	Ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares
mARN	ARN mensajero
NC	Núcleo cromocéntrico
NR	Núcleo reticulado
PAP	Poli(A) polimerasa
Pre-mARN	ARN pre-mensajero
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
RNPs	Ribonucleoproteínas
TBST	Amortiguador de tris salino
TEMMET	Microscopio electrónico de transmisión

RESUMEN

Los gránulos de *Lacandonia* (GLs) son partículas de ribonucleoproteínas de 32 nm de diámetro y fueron descritos en los núcleos reticulados (NR) de *Lacandonia schismatica* y de *Triuris brevistylis* (monocotiledóneas). En este trabajo se exploró su existencia dentro del reino Plantae, para ello, se examinaron ejemplares de los principales clados vegetales con microscopía electrónica de transmisión. Los resultados indican que *Coleochaete* (alga verde considerada por muchos autores como el grupo hermano de las plantas), los grupos primitivos de Hepatophyta y Bryophyta, así como las Lycophyta, Monilophyta, Coniferales, Cycadales, Ginkgoales, Gnetales, *Amborella* e *Illicium* (dicotiledóneas), *Lacandonia schismatica* y *Triuris* (monocotiledóneas) presentan GLs. Otras algas verdes examinadas, todas las Anthocerotophyta y algunas Hepatophyta y Bryophyta *sensu stricto* no primitivas, así como la mayoría de las dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas poseen núcleo cromocéntrico (NC) y carecen de GLs. En las monocotiledóneas generalmente el núcleo es NR y sin GLs, a excepción de los Triuridales (*Lacandonia* y *Triuris*). Los datos obtenidos indican que en casi todos los grupos primitivos de las plantas y en *Coleochaete* la presencia de GLs esta correlacionada con un alto contenido de ADN. Por ello, se exploró el tipo de núcleo de una especie de ajolote (*Ambystoma rivulare*), dado que la mayoría de los anfibios poseen un alto contenido de ADN y que enfrentan el problema de sobrevivir simultáneamente, como lo hicieron en su momento las primeras plantas terrestres, en el medio ambiente terrestre y acuático. Sorprendentemente, estos vertebrados presentan NR con gránulos semejantes a los GLs, en lugar del típico NC con gránulos intercromatinianos y pericromatinianos, descrito para los vertebrados a partir de especies de mamíferos y aves, lo que resulta en un hallazgo inédito hasta la fecha.

ABSTRACT

The *Lacandonia* granules (LGs) are ribonucleoprotein particles 32 nm in diameter and were described in the reticulate nucleous (RN) of *Lacandonia schismatica* and *Triuris brevistylis* (monocots). This paper explored its existence within the kingdom Plantae. For this, specimens of the main plant clades were examined with transmission electron microscopy. The results indicate that *Coleochaete* (a green algae considered by many authors as the sister group of plants), the primitive groups Hepatophyta and Bryophyta, and the Lycophyta, Monilophyta, Coniferales, Cycadales, Ginkgoales, Gnetales, *Amborella* and *Illicium* (dicots), *Lacandonia schismatica* and *Triuris* (monocots) have LGs. Other green algae examined, all the Anthocerotophyta, and some Hepatophyta and Bryophyta sensu stricto, not primitive, as well as most dicotyledonous and some monocotyledonous have cromocentric nucleous (CN) and lack LGs. In the monocots the nucleous is generally reticulate without LGs, except Triuridales (*Lacandonia* and *Triuris*). The data indicate that in most primitive groups of plants and *Coleochaete*, the presence of LGs is correlated with high DNA content. Thus, the nucleous type of a species of salamander (*Ambystoma rivul*) was examined, since most amphibians have a high DNA content and facing the problem of survival simultaneously in the terrestrial and aquatic environment, as they did at the moment the first land plants. Surprisingly, these vertebrates have similar RN with granules similar to LGs, instead of the typical CN with intercromatinian and pericromatinian granules described for vertebrates of species of mammals and birds, resulting in an unprecedented discovery to date.

INTRODUCCIÓN

El núcleo es un compartimiento celular limitado por una envoltura nuclear interrumpida por los poros, que aloja al material genético constituido por el ácido desoxirribonucleico (ADN) y los componentes necesarios para la transcripción de la información genética del ácido ribonucleico (ARN), para el procesamiento del ARN y la duplicación del ADN en los procesos de división celular (Vázquez Nin *et al*, 2003).

Los componentes del núcleo se pueden agrupar en cuatro categorías, de acuerdo a su composición molecular y al tipo de ultraestructura. Cabe señalar que hasta el momento la mayor parte del conocimiento sobre la ultraestructura del núcleo interfásico ha derivado del estudio de los animales, en particular de los mamíferos (Vázquez Nin *et al*, 2003).

Componentes desoxirribonucleoproteicos (cromatina).

La cromatina está constituida por ácido desoxirribonucleico (ADN) y proteínas. Ambas sustancias forman unidades estructurales repetidas llamadas nucleosomas y cada uno de ellos tiene un tramo de ADN de alrededor de 200 pares de bases de largo que rodea helicoidalmente a un octámero de histonas (ver figura 1). Los nucleosomas están unidos entre sí por 20 a 80 pares de bases, para constituir el "collar de perlas" o fibra de 10 nm. En el siguiente nivel de organización, la histona H1 (y otras proteínas del tipo no histona) se enlaza al ADN que une a cada nucleosoma para establecer una hélice o solenoide de 30 nm de diámetro (ver figura 1). Cada vuelta de un solenoide contiene seis nucleosomas con una molécula de H1 asociada a cada unidad nucleosómica. La

fibra se enrolla sobre sí misma y después se organiza en asas que unidas forman los cromosomas (Ramírez y Gómez, 2003), como puede verse en la figura 1.

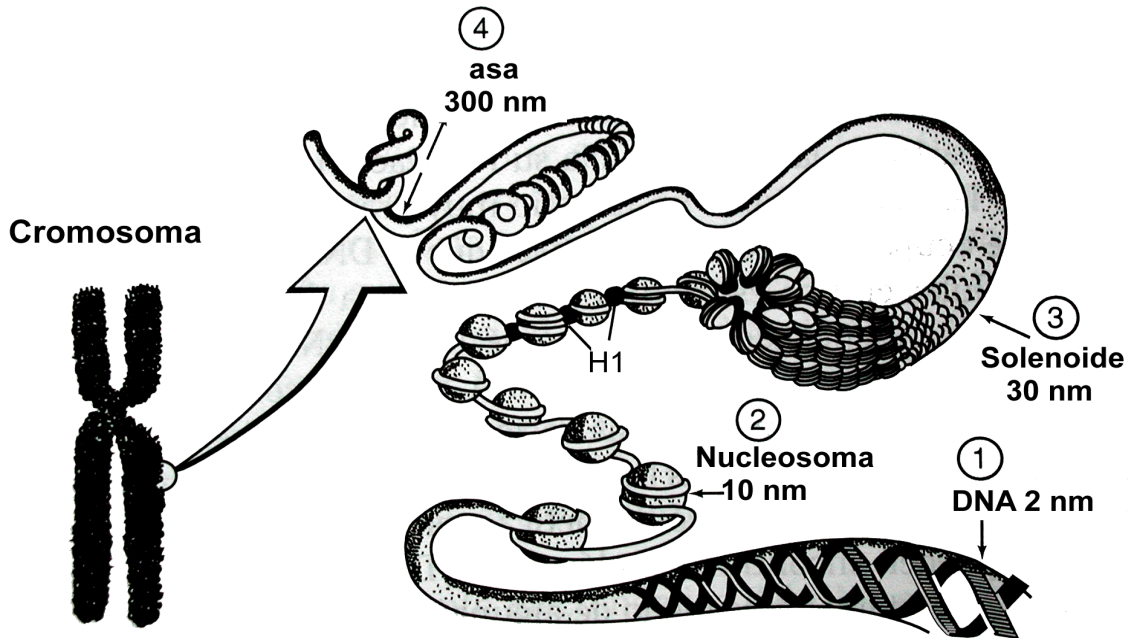


Figura 1. Estructura de la cromatina en los cromosomas metafásicos. Molécula de ADN (1) y nucleosoma (2). La histona H1 compacta a los nucleosomas y estos forman una hélice o solenoide (3); el solenoide se organiza en asas de 60 nm de diámetro y 300 nm de largo (4) (tomado de Ramírez y Gómez, 2003).

La cromatina es fácil de ver en núcleos mitóticos o meióticos a través de microscopía óptica y electrónica, debido a su gran compactación espacial. En el caso de los núcleos interfásicos los cromosomas no pueden ser observados, pues en este período de activa transcripción y duplicación de ADN solamente es posible ver cúmulos de cromatina de diferente tamaño y disposición, algo diferente y propio de cada una de las distintas estirpes celulares y estados citofisiológicos (Vázquez Nin *et al*, 2003). La cromatina compacta o heterocromatina es fácil de observar pues forma grumos o cúmulos esencialmente a la periferia del núcleo (adosada a la envoltura nuclear) y se trata de

cromatina que no tiene actividad de transcripción; en cambio, la cromatina laxa o eucromatina que tiene todo su material desplegado en forma de delgados filamentos está fuera de la resolución del microscopio óptico. En contraste, ambas cromatinas laxa y compacta pueden observarse en microscopio electrónico mediante técnicas especiales de contraste (Vázquez Nin y Bernhard, 1973; Vázquez Nin *et al*, 2003). La demostración de que la transcripción ocurre en la eucromatina fue hecha por Fakan y Bernhard (1971; 1973) mediante la técnica de autorradiografía ultraestructural después del marcado con uridina tritiada.

Lo genes situados en la cromatina laxa, tienen la posibilidad de expresarse si los reguladores de la transcripción lo permiten, hecho que no cambia su grado de compactación (Vázquez Nin *et al*, 2003). La cromatina compacta se divide en dos tipos, la constitutiva y la facultativa. En el caso de la primera, ambos pares alélicos están siempre compactados en todas las células y se encuentra constituida por secuencias repetidas abundantemente en las regiones aledañas al centriolo, aunque no necesariamente restringidas a estas zonas. La heterocromatina facultativa puede tener secuencias de uno de los miembros de un par alélico o bien estar todo el cromosoma condensado, mientras que el otro miembro del par puede no formar parte de cúmulos semejantes (Vázquez Nin *et al*, 2003).

En la mayoría de los núcleos interfásicos de hongos, plantas y animales, la heterocromatina forma grumos adheridos a la envoltura nuclear, rodeando al nucléolo y en menor medida distribuidos en el nucleoplasma, es decir su arreglo es cromocéntrico. La eucromatina forma asas en la periferia de la heterocromatina que se adentran al nucleoplasma de acuerdo con su longitud (Vázquez Nin *et al*, 2003). En algunas plantas, como la cebolla, el arreglo es reticulado pues la heterocromatina forma cordones que ocupan homogéneamente el volumen del núcleo. La diferente arquitectura de la cromatina parece tener relación con el contenido de ADN. Según Nagl (1985) los vegetales de bajo contenido de ADN poseen núcleo cromocéntrico (“diffuse/ chromocentric nuclei”, según este autor) y los que presentan alto contenido tienen núcleo reticulado (“chromonematic nuclei”, de acuerdo con Nagl), pero reconoce

un estado intermedio (ver esquema de la derecha de la figura 2). El mismo autor, hace una gráfica con los pocos datos disponibles en ese tiempo del contenido de los núcleos vegetales (2C) contra el nivel de condensación (ver el esquema de la izquierda de la figura 2) y puede interpretarse de sus datos (dado que él no lo señala) que los núcleos cromocéntricos (2C) tienen 10 pg o menos de ADN, es decir alrededor de 5 pg (1C) si se usa la nomenclatura en boga para registrar a este tipo de datos.

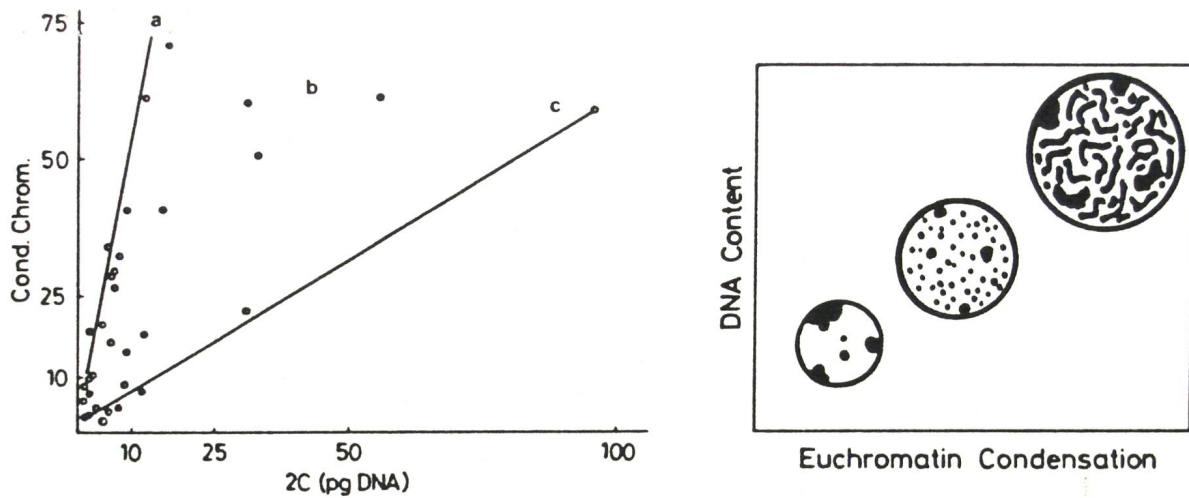


Figura 2. A la izquierda, Nagl (1985) señala que la recta **a** corresponde a dicotiledóneas con poco contenido de ADN, la nube de puntos **b** corresponde a núcleos de monocotiledóneas y finalmente, la recta **c** pertenece a los datos de dicotiledóneas con alto contenido de ADN. A la derecha, el mismo autor presenta los tipos de núcleo de acuerdo al contenido de cromatina, pero no ofrece datos de los contenidos de ADN en cada tipo de núcleo.

En el núcleo en interfase, los cromosomas están organizados en regiones que reciben el nombre de territorios cromosómicos, que se encuentran separados por canales denominados dominios intercromatinianos (ver figura 3). En esta etapa del ciclo celular, los cromosomas tienen genes transcripcionalmente activos en la vecindad de los canales intercromosómicos adyacentes a los territorios y una mayor superficie de contacto con éstos.

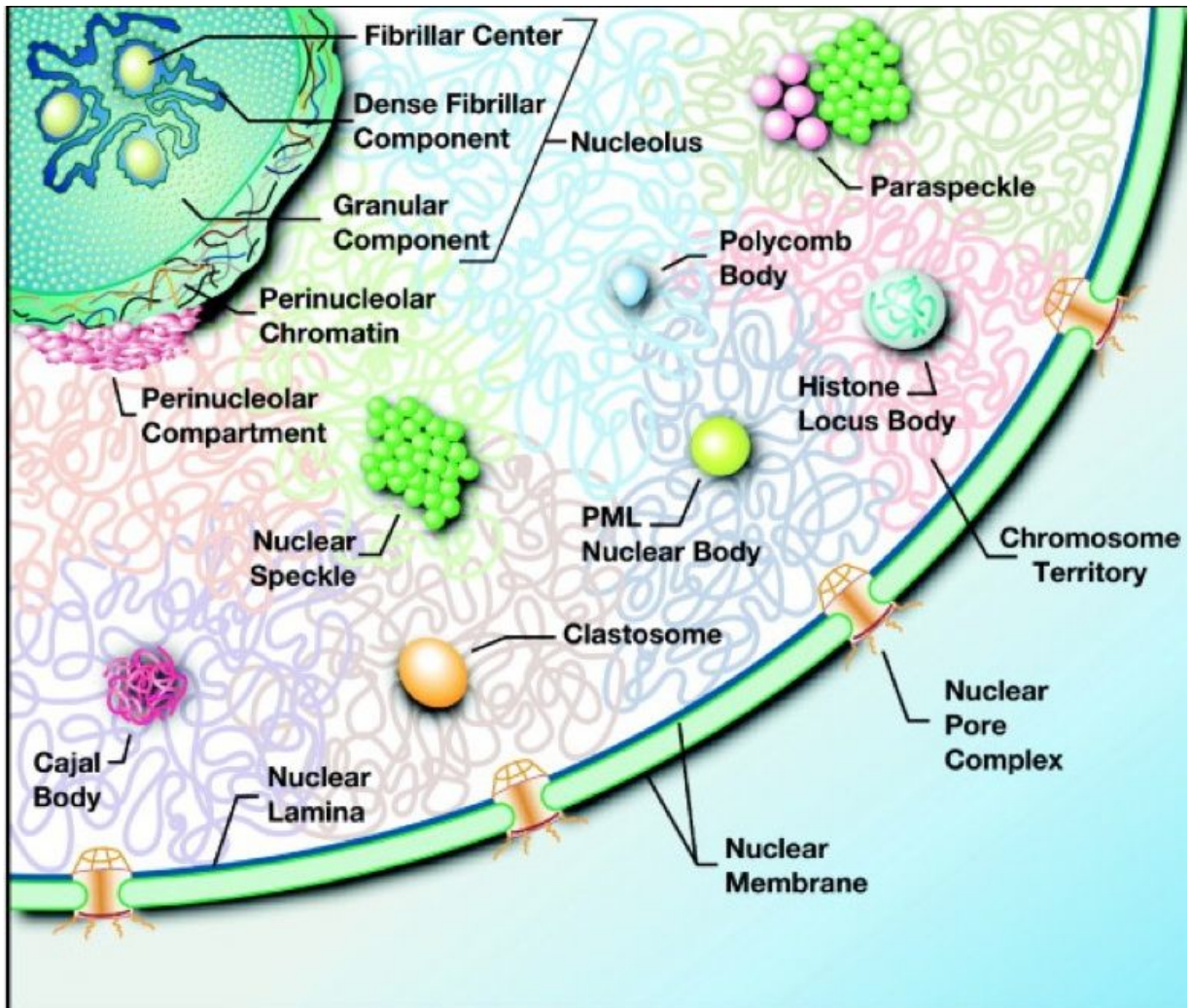
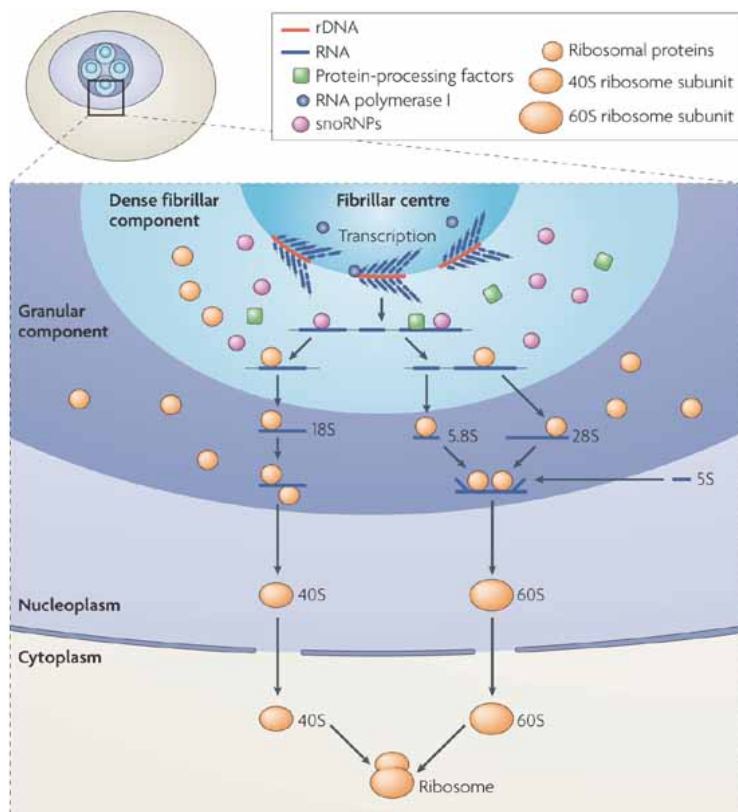


Figura 3. Organización general de un núcleo interfásico de mamífero. Se ve la ultraestructura del nucleólo, los diferentes territorios cromosómicos (en diferentes colores), los cuerpos de Cajal involucrados en la modificación de snARN y snoARN, y en el ensamble y tráfico de snRNP y snoRNP, los clastosomas que se forman en respuesta a la activación específica de la proteólisis proteosoma dependiente (contiene proteosomas 20S y 19S), cuerpos de localización de histona (involucrados en la transcripción y proceso de histona en pre-mARN), manchas o moteados nucleares (conjuntos de gránulos intercromatinianos), cuerpos de estrés del núcleo (contienen ARN satélite tipo III), "paraspeckles" (involucradas en la retención de A-to-I mARN hipereditados), compartimento perinucleolar (no se sabe su función, posible relación con metástasis), cuerpo nuclear PML (involucrado en la respuesta a muchas formas de estrés, defensa viral y estabilidad del genoma), cuerpo polycomb (involucrado en proteínas polycomb que regulan y silencian genes particulares en *Drosophila*, no se sabe su función en otros organismos). Tomado de Mao et al (2011).

Estructuras ribonucleoproteicas

El nucleólo es la estructura ribonucleica mejor conocida, tiene una forma generalmente esférica y es posible distinguir en el microscopio electrónico de transmisión, mediante

las técnicas tradicionales de fijación y tinción (acetato de uranilo y citrato de plomo), los centros fibrilares, el componente fibrilar denso, el componente granular y los centros fibrilares heterogéneos. El componente fibrilar del nucléolo de plantas y animales tiene los genes ribosómicos (rADN, 18s, 5.8s y 28s), ARN polimerasa I, las proteínas del organizador nucleolar, fibrilarina y las fosfoproteínas C23 y B23, es el sitio de mayor actividad de transcripción y de procesamiento temprano del pre-rADN. En el componente granular sucede el procesamiento tardío de maduración y almacenamiento de los pre-ribosomas (Jiménez- García *et al*, 1998) (ver figura 4).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 4. Modelo de biogénesis de los ribosomas. La transcripción del ADN ribosómico (rADN) por la ARN polimerasa I se produce ya sea en los centros fibrilares (FC) o en el límite entre la FC y en el componente fibrilar denso (DFC). Los transcritos de ARN pre-ribosomales sufren “splicing” y son modificados por ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares (snoRNPs) en el DFC. La maduración final de la ribonucleoproteína pre-ribosómica y el ensamblaje con las proteínas ribosómicas se produce principalmente en el componente granular (GC). En el GC, los 5.8S y 28S ARN ribosómicos (rARN) se ensamblan con el 5S rARN transcrito para formar la subunidad 60S, mientras que los 18S rARN solo se ensamblan para formar la subunidad 40S del ribosoma. Las subunidades 40S y 60S del ribosoma se exportan al citoplasma, donde se unen a mRNA para constituir los ribosomas funcionales. Tomado de Boisvert *et al* (2007).

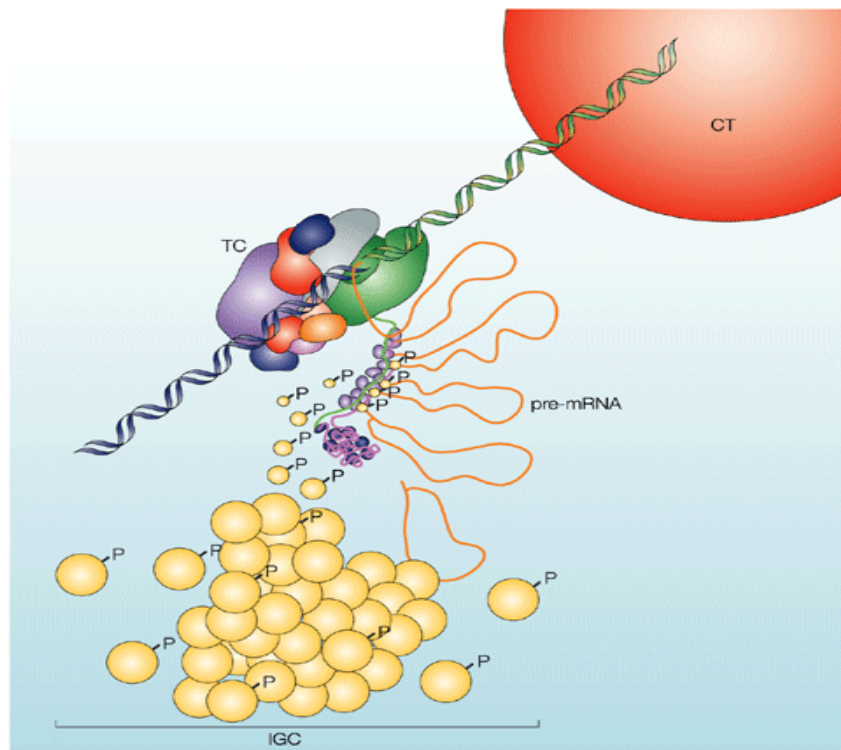
Las fibras pericromatinianas (FCPs) se ubican en la periferia de la cromatina compacta y su presencia es universal (Fakan, 1994). Incorporan uridina tritiada rápidamente por lo que son la expresión morfológica de los transcritos nacientes de pre-ARN (Fakan, 1994). Vázquez-Nin *et al* (2003), proponen que las FCPs después del “splicing” se pliegan para formar a los gránulos pericromatinianos (GPCs). En plantas se conocen en *Lacandonia schismatica*, (Agredano-Moreno, 2001) y *Ginkgo biloba*, (Jiménez *et al*, 2002), donde las FCPs forman un arreglo fibro-granular con los gránulos de Lacandonia (GLs).

Los gránulos pericromatinianos (GPCs) fueron descubiertos por Watson (1962) y caracterizados por Monneron y Bernhard (1969), como estructuras esféricas de 30 a 50 nanómetros, rodeadas por un halo de 20 a 25 nanómetros. Vázquez Nin y Bernhard (1973) y Vázquez Nin *et al* (2003) señalan que los GPCs contienen mARN de manera análoga lo que se ha observado en los gránulos de los anillos de Balbiani producidos a partir del mARN en los cromosomas politénicos de las glándulas salivales de *Chironomus tentans*. En plantas han sido hallados en una dicotiledónea, *Chirantodendron pentadactylon* (Echeverría *et al*, 1999).

Los gránulos intercromatinianos (GICs) fueron descritos por Swift (1959), como partículas que forman cúmulos en las regiones intercromatinianas. Monneron y Bernhard (1969) señalan que tienen 20 a 25 nm de diámetro, son polimorfos y en ocasiones estructuran un continuo con fibrillas. Visa *et al* (1993), mediante la técnica de hibridación *in situ* lograron localizar la presencia de RNAbpmU en los cúmulos de GICs. Dado que estos gránulos están relacionados con el procesamiento co-transcripcional del pre-mARN y que no contienen ARN de marcado rápido, ni proteínas ni ARN pre-mensajero ni mensajero (Fakan *et al*, 1984), es posible que los cúmulos de GICs sean almacenes de los factores de “splicing” (Vázquez Nin *et al*, 2003). Aunque contradictoriamente (Visa *et al*, 1993) registran la presencia de poli(A)+ARN en los grupos de GICs, mediante hibridación *in situ* de alta resolución. Lamond y Spector (2003), hacen una revisión de muchísimos trabajos realizados sobre los GICs en los que se comprueba lo dicho por Fakan *et al* (1984) y se aborda la complejidad de su

funcionamiento y de su composición. En la figura 5, se ilustra de manera esquemática un modelo del proceso de reclutamiento de factores de “splicing” a los sitios de transcripción activa y su intervención en la maduración del pre-mARN. Por otra parte, señalan Lamond y Spector (2003) que el poli(A)+ ARN hallado en los cúmulos de GICs nunca han sido localizados en el citoplasma.

Los GICs existen en plantas, animales y hongos, son particularmente abundantes en las células de los vertebrados, pero son muy escasos en cefalocordados, invertebrados, plantas y hongos (Jiménez-García *et al*, 1989).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 5. Modelo de funcionamiento y localización de los cúmulos de GICs. Los cúmulos se forman como resultado de la interacción proteína-proteína entre los factores “splicing” del pre-mARN y otros constituyentes en la transición telofase/G1. Un factor de intercambio de nivel basal aparece entre los cúmulos y la poza nucleoplasmica que es regulada por la fosforilación/desfosforilación en una manera específica en cada tipo de célula. La modulación del nivel de fosforilación de las proteínas del cúmulo resulta en un incremento en la liberación y el reclutamiento hacia los sitios de transcripción. El modelo no está a escala. CT territorio cromosómico, IGC cúmulo de gránulos intercromatinianos, TC complejo de transcripción, pre-m ARN. (Tomado de Lamond A.I. y Spector D.L. 2003).

Los gránulos de *Lacandonia* (GLs) se distribuyen en todo el espacio intercromatiniano y pericromatiniano, fueron descritos por Jiménez-García *et al* (1992) en *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). Son partículas muy abundantes con un diámetro de alrededor de 32 nanómetros, aparentemente están en el rango de tamaño de los GPCs (30-50 nanómetros) pero no se encuentran restringidos al espacio pericromatiniano. La presencia de una cola de poli(A) (poliadenilación) en los GLs y en las fibras pericromatinianas asociadas a ellos, hace pensar que los GLs contienen mARNs y que son estructuras equivalentes a los gránulos pericromatinianos (Agredano-Moreno y Jiménez-García, 2000). La poliadenilación se encuentra en casi todos los eucariontes y es importante porque da estabilidad al mARN, promueve la eficiencia en la traducción del mismo y tiene algún papel en el transporte del mARN al citoplasma.

La presencia de proteínas SR en los GLs, hace proponer a Agredano-Moreno y Jiménez-García (2000) que éstos se encuentran relacionados con eventos post-transcripcionales como el almacenamiento y/o transporte de mARNs. Las proteínas SR están entre los factores de “splicing” que no forman snRNPs mejor caracterizados, son importantes en el ensamblaje del “spliceosoma” y en el “splicing”, además de procesos post-“splicing” como el transporte del mARN a través del núcleo y en la translocación de estas partículas por el poro nuclear.

JUSTIFICACIÓN.

La importancia del hallazgo de una nueva partícula de ribonucleoproteínas (los GLs) en las Triuridales, hace relevante su búsqueda en todos los taxones del reino Plantae para rastrear su origen y distribución.

OBJETIVOS.

Estudiar la presencia de gránulos de *Lacandonia* y el tipo de cromatina en el núcleo interfásico en los principales grupos del Reino Plantae.

METODOLOGÍA.

En primer lugar, se hizo una exploración del núcleo de los principales grupos del reino Plantae, para ello las muestras se obtuvieron del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM, de la colecta de especímenes silvestres, *Nitellopsis* sp. fue una amable donación del Dr. Gustavo Montejano Zurita del Departamento de Biología Comparada de la Facultad de Ciencias, UNAM, la langosta terrestre, *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Acrididae) fue obsequiada por el Dr. Zenón Cano del Departamento de Ecología y Recursos Naturales de la Facultad de Ciencias, UNAM y *Coleochaete scutata* fue comprada en cultivo puro en Estados Unidos de América.

Las especies estudiadas en el presente trabajo fueron:

GRUPO	GENERO
Algas verdes	<i>Chlamydomonas</i> sp., <i>Klebsormidium</i> sp., <i>Zygnema</i> sp., <i>Chara</i> sp., <i>Nitellopsis</i> sp. y <i>Coleochaete scutata</i> (Charophytaceae).
Briofitas sensu lato	<i>Anthoceros</i> sp. <i>Megaceros</i> sp. (Anthocerophyta), <i>Monoclea</i> sp., <i>Marchantia</i> sp. y <i>Metzgeria</i> sp. (Hepatophyta), <i>Andreaea</i> sp., <i>Sphagnum</i> sp. y <i>Barbula</i> sp. (Bryophyta sensu stricto).
Lycophyta	<i>Lycopodium</i> sp. y <i>Selaginella</i> sp.
Monilophyta	<i>Equisetum</i> sp., <i>Psilotum nudum</i> , <i>Adiantum capillus-veneris</i> , <i>Marattia mexicana</i> , <i>Marsilea</i> sp., <i>Salvinia</i> sp., <i>Platycreum</i> sp. y <i>Nephrolepis</i> sp.
Coniferales	<i>Podocarpus reichei</i> , <i>Taxodium mucronatum</i> , <i>Sequoia sempervirens</i> , <i>Cupressus lusitanica</i> , <i>Pinus lagunae</i> .
Ginkgoales	<i>Ginkgo biloba</i> .
Gnetales	<i>Ephedra compacta</i> .
Cycadales	<i>Ceratozamia</i> sp.
Angiospermas	Dicotiledóneas: <i>Magnolia grandiflora</i> , <i>Ceratophyllum</i> sp., <i>Piper auritum</i> , <i>Jatropha elbae</i> , <i>Alnus jorullensis</i> , <i>Peniocereus</i> sp., <i>Mathiola incana</i> , <i>Amborella trichocarpa</i> ,

Illicium floridanum, *Licopersicum sculentum*, *Solandra guerrerensis*, *Simmondsia sinensis*, *Senecio sp.*, *Cucumis sp.*, *Voyria sp.*

Monocotiledóneas: *Encyclia*, *Zea mays*, *Heliconia sp.*, *Astrocaryum mexicanum*, *Allium cepa*, *Lacandonia schismatica*, *Gymnosiphon sp.*

I. Fijación, post-fijación, inclusión, corte y observación de todas las muestras estudiadas

Los fragmentos de hojas o tallos jóvenes en plantas vasculares o talos vegetativos en briofitas *sensu lato* o algas se fijaron en glutaraldehído al 6 % y paraformaldehído al 4% disuelto en amortiguador de fosfatos (PBS) a un pH de 7.2 durante un período de 24 horas. La postfijación se realizó en tetróxido de osmio al 1% durante toda una noche. Después, las muestras se deshidrataron gradualmente en etanol de distinto grado y fueron embebidas en resina epóxica (ether glycide 100. Merck). Los bloques polimerizados con las muestras se cortaron en el ultramicrotomo. Los primeros cortes semifinos (300 a 500 nm de grosor) teñidos con azul de toluidina permiten observar, en microscopio óptico, las zonas con mayor concentración de núcleos. En estas regiones se efectúan los cortes finos (60-90 nm de espesor), de color dorado-plateado, que se montan en rejillas de cobre cubiertas por membrana plástica (formvar) y se contrastan con acetato de uranilo y citrato de plomo. Y finalmente, se observaron al microscopio electrónico Carl Zeiss EM10 operando a 80 kV y se tomaron fotografías.

II. Caracterización del núcleo de *Ginkgo biloba*, a fin de establecer si su ultraestructura es equivalente a la descrita en *Lacandonia schismatica* por Jiménez-García *et al* (1992), como lo indican los resultados preliminares.

1. Microscopia de fuerza atómica. Los cortes semifinos teñidos con azul de toluidina, obtenidos con el procedimiento descrito en los párrafos anteriores y que corresponden a la microscopia convencional, se observaron siguiendo las indicaciones de Jiménez-García y Fragoso–Soriano (2000) y Jiménez-García y Segura-Valdez (2002).

2. Método regresivo con EDTA para RNPs, de acuerdo a Bernhard (1969) y modificado por Spector et al (1998). Los fragmentos de hoja se fijaron durante 24 horas en paraformaldehído al 4% disuelto en amortiguador de fosfatos a un pH de 7.2. Después, la muestra se incluyó en resina Lowicryl K4M de acuerdo a Roth (1986). De los bloques se obtienen cortes semifinos para observarlos en el microscopio de fuerza atómica y cortes finos para analizar los GLs, utilizando el contraste de acetato de uranilo-citrato de plomo, además de hacer la técnica de inmunolocalización ultraestructural y la de hibridación *in situ* ultraestructural de ARN total.

3. Inmunolocalización ultraestructural. Los cortes ultrafinos de la muestra incluida en Lowycril K4M, se colocaron en rejillas de oro cubiertas con formva y después se hicieron flotar en amortiguador de Tris salino (TBST) con 20 mM Tris (pH 7.6), 150 mM Na Cl, 20 mM de azida de sodio, tween-20 al 1.0%, suero de albúmina de bovino (BSA) al 10% y suero normal de cabra (NGS) durante 60 minutos. Posteriormente, las rejillas se incuban en el anticuerpo monoclonal anti-SR 3C5, donado por D. Spector (CSHL), diluido 1:30 en TBST a 4 grados centígrados por 16 horas en una cámara húmeda. Algunas rejillas se flotaron por 15 minutos en TBS sin anticuerpo como testigo negativo. Las rejillas se lavan por goteo de TBST durante 15 minutos, se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario cabra-anti-ratón (goat-anti-mouse IGM), acoplado a partículas de oro coloidal de 10 nm y diluido 1:10 en TBST. A continuación las rejillas se enjuagan en TBST durante 15 minutos y 10 minutos en agua desionizada. Finalmente, los cortes se contrastan con acetato de uranilo al 3% y citrato de plomo al 0.3% durante 20 minutos y se observan en el microscopio electrónico Carl Zeiss EM10 operando a 80kV.

4. Hibridación *in situ* ultraestructural de ARN total. La hibridación para localizar ARN total se hace según las técnicas descritas por López-Velázquez et al (1998). Agredano-Moreno y Jiménez-García (2000), usando el ADN genómico como sonda, el cuál se obtiene de las hojas de *Ginkgo biloba* de acuerdo a los protocolos establecidos (Sambrook et al, 1989).

RESULTADOS.

Por motivos de claridad, primero se presentan los resultados sobre *Ginkgo biloba* y después sobre la exploración del Reino Plantae.

Ultraestructura del núcleo de *Ginkgo biloba* (Ginkgoales).

En la exploración de los distintos grupos del reino Plantae, se eligió al núcleo reticulado de *Ginkgo biloba*, una especie de gimnosperma muy primitiva que se ha mantenido sin cambios apreciables durante los últimos 50 millones de años, como ejemplo para comparar su ultraestructura con la descrita en *Lacandonia schismatica* (monocotiledónea) por Jiménez-García *et al* (1992) y establecer si las gimnospermas y las monilofitas tienen una ultraestructura igual o semejante a la de la última especie. El núcleo de *G. biloba* es reticulado como lo muestran las figuras 6a, 6b, 6c y 7, en microscopía de luz, en microscopio de fuerza atómica y en microscopía electrónica de transmisión. A través del uso de un anticuerpo monoclonal para el reconocimiento de ADN, seguido de un anticuerpo secundario acoplado a oro coloidal de 10 nm, es posible observar en el microscopio electrónico (figura 8), una tinción intensa en la cromatina, en contraste, es notable su ausencia en el citoplasma y en el nucleoplasma. Por otra parte, en la figura 7, preparada con microscopía electrónica de transmisión convencional, es evidente la presencia de abundantes partículas de 32 nm en los espacios intercromatiniano y pericromatiniano que pueden ser identificadas como GLs.

La hibridación *in situ* ultraestructural de ARN produjo una tinción muy intensa en el nucleoplasma (figura 9), donde los GLs son abundantes. Estos son muy evidentes a gran aumento con técnicas convencionales de microscopía electrónica (figura 10a), como en la tinción con la técnica regresiva de EDTA para RNPs (figura 10b), algo semejante a lo observado por Jiménez-García (1992) para *Lacandonia schismatica* y *Triuris brevistylis* (monocotiledóneas del orden Triuridales) y por Guzmán (2003) en su tesis de maestría en *Illicium floridanum* (dicotiledónea). La presencia de ARN en los

GLs fue también observada en la prueba de hibridación *in situ* usando el ADN genómico de *Ginkgo biloba* (figura 11). Los GLs han sido marcados con anticuerpos anti-snRNPs (Agredano-Moreno et al, 1994), la cantidad de GLs varía en función del desarrollo floral (Agredano-Moreno y Jiménez-García, 2000), tal como sucede en el desarrollo animal (Vázquez-Nin y Echeverría, 1996), además contienen proteínas SR como los gránulos de los anillos de Balbiani. Aunque la distribución de los GLs en el espacio inter y pericromatiniano, la presencia de proteína SR y de poli(A)+ARN sugiere una similitud con los GICs. Pero, la abundancia de GLs en la región pericromatiniana, donde la transcripción tiene lugar, apoya una función más parecida a la de los gránulos pericromatinianos y de los anillos de Balbiani. Jiménez *et al* (2002), señalan por primera vez la existencia de GLs en las gimnospermas, RNPs que solamente habían sido observados en las Triuridales (monocotiledóneas), grupo que incluye a la *Lacandonia schismatica*, única angiosperma donde la flor tiene a los estambres en el centro y rodeados por los carpelos, organización inversa a lo conocido en el resto de las angiospermas.

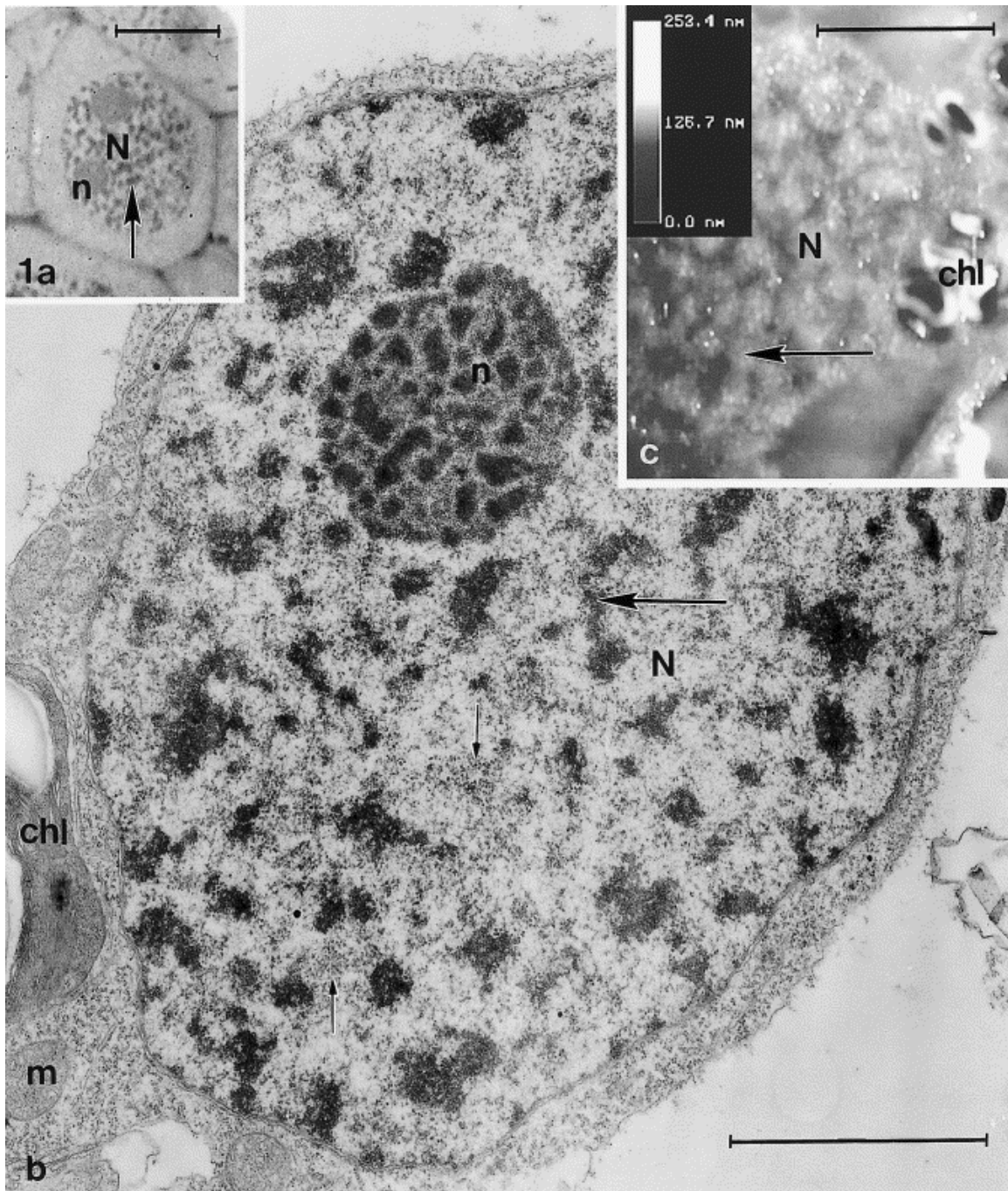


Figura 6. Núcleo de *Ginkgo biloba*. (a) Imagen obtenida con microscopio de luz, corte semifino teñido con azul de toluidina, barra 10 μm . (b) Imagen obtenida con microscopio electrónico de transmisión, corte contrastado con acetato de uranilo-citrato de plomo, barra 3 μm . (c) Imagen obtenida con microscopio de fuerza atómica, barra 5 μm . Núcleo interfásico (N), cromatina (flechas grandes), nucléolo (n), cloroplasto (chl), mitocondria (m), textura fibrogranular (flechas pequeñas).

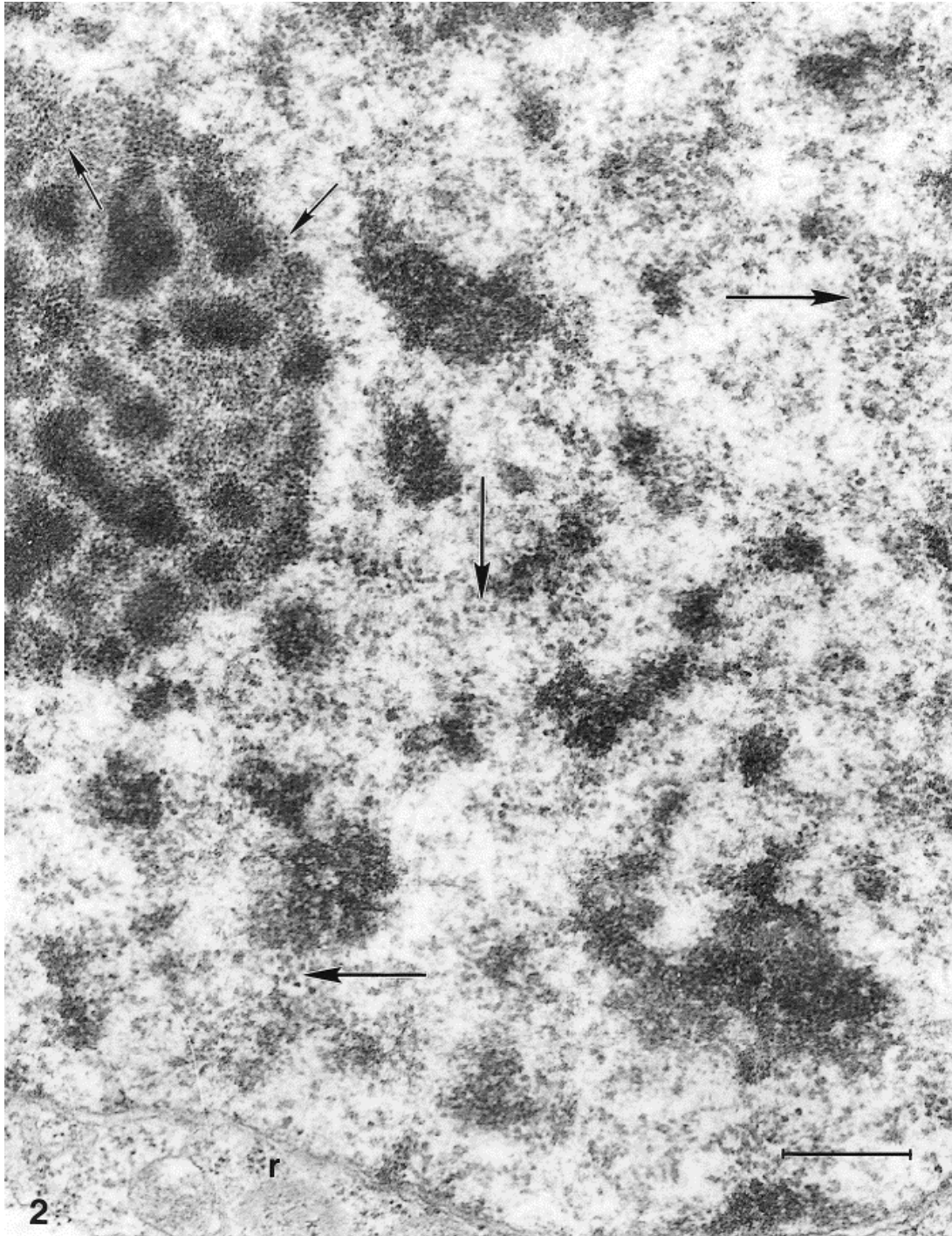


Figura 7. Micrografía electrónica de transmisión de alta resolución de núcleo de *Ginkgo biloba*. Dentro del nucleoplasma hay numerosas partículas de 32 nm (flechas grandes). Para efectos de comparación son mostradas otras partículas RNPs como los ribosomas (r) en el citoplasma y pre-ribosomas (flechas pequeñas). Barra 500 nm.

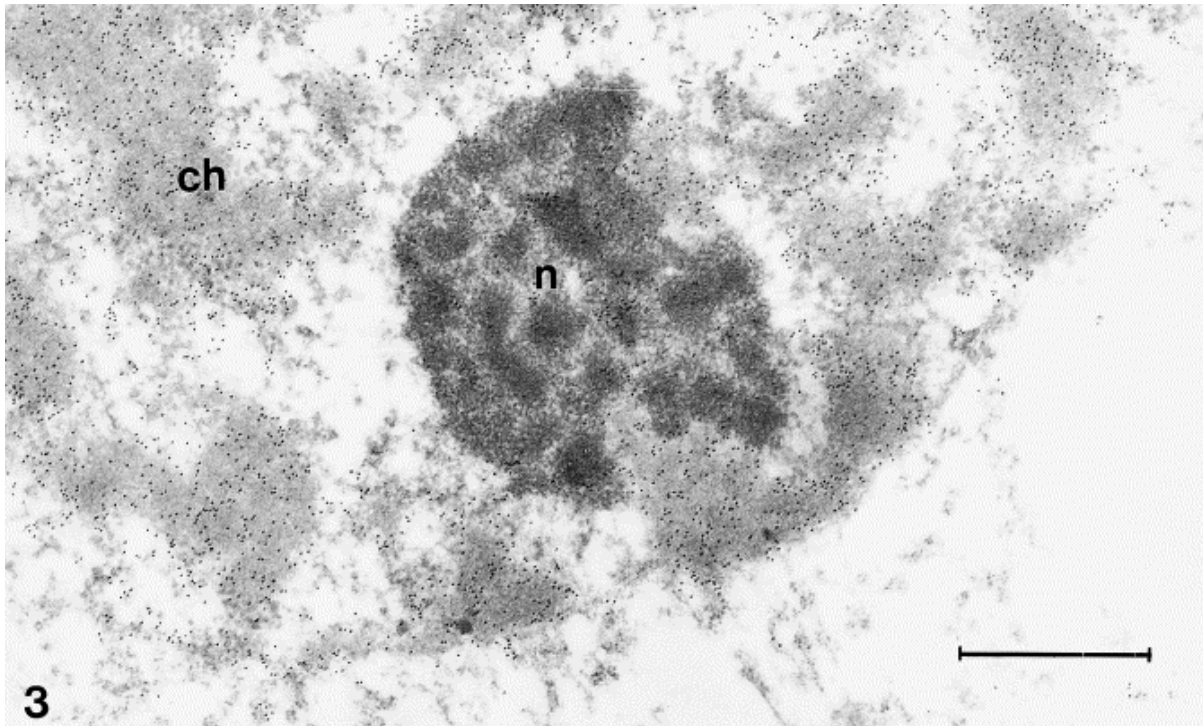


Figura 8. Inmunolocalización ultraestructural de ADN de *Ginkgo biloba*, vista en microscopio electrónico de transmisión. La cromatina (ch) reticulada está fuertemente marcada. Contraste de acetato de uranilo-citrato de plomo. Nucléolo (n). Barra 1 μm .

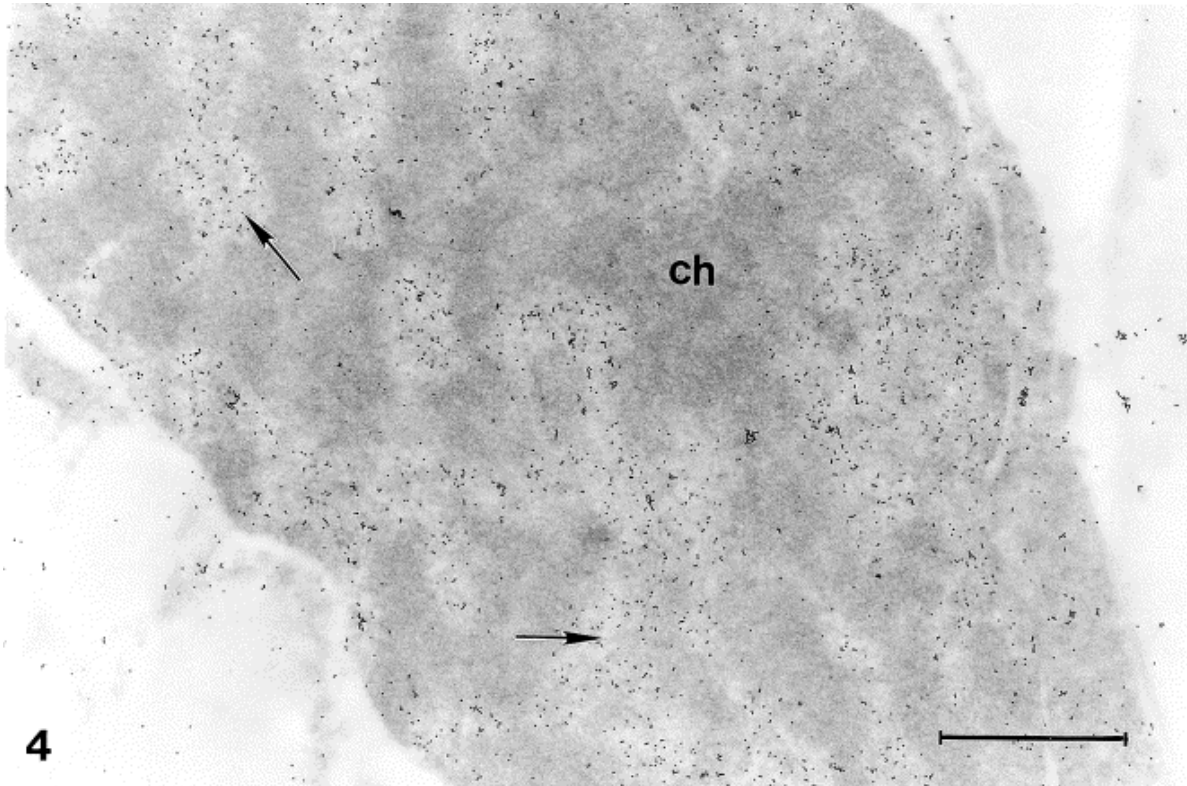


Figura 9. Localización de ARN a través de hibridación ultraestructural *in situ* en el núcleo de *Ginkgo biloba*. La tinción es intensa en el nucleoplasma (flechas), mientras que en la cromatina es muy baja. Barra 1 μ m.

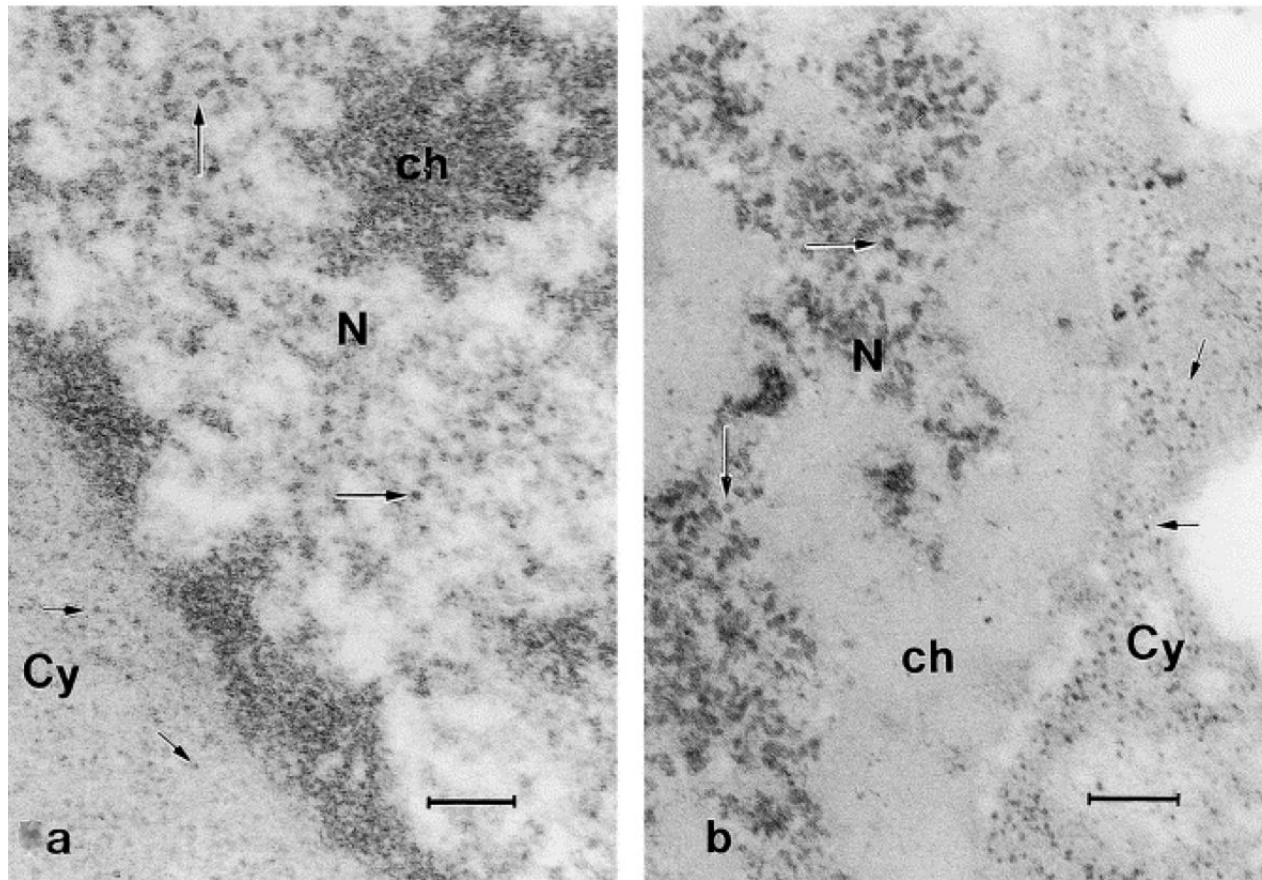


Figura 10. Imágenes obtenidas en microscopio electrónico de transmisión del núcleo de *Ginkgo biloba* utilizando contraste de acetato de uranilo-citrato de plomo (a) y el método regresivo de EDTA (b) para RNPs. En ambas figuras se pueden observar los gránulos de *Lacandonia* (flechas grandes) en el núcleo (N) asociados a fibras de RNP. Los ribosomas (flechas pequeñas) pueden verse en el citoplasma (Cy). Cromatina (ch). Barras 200 nm.

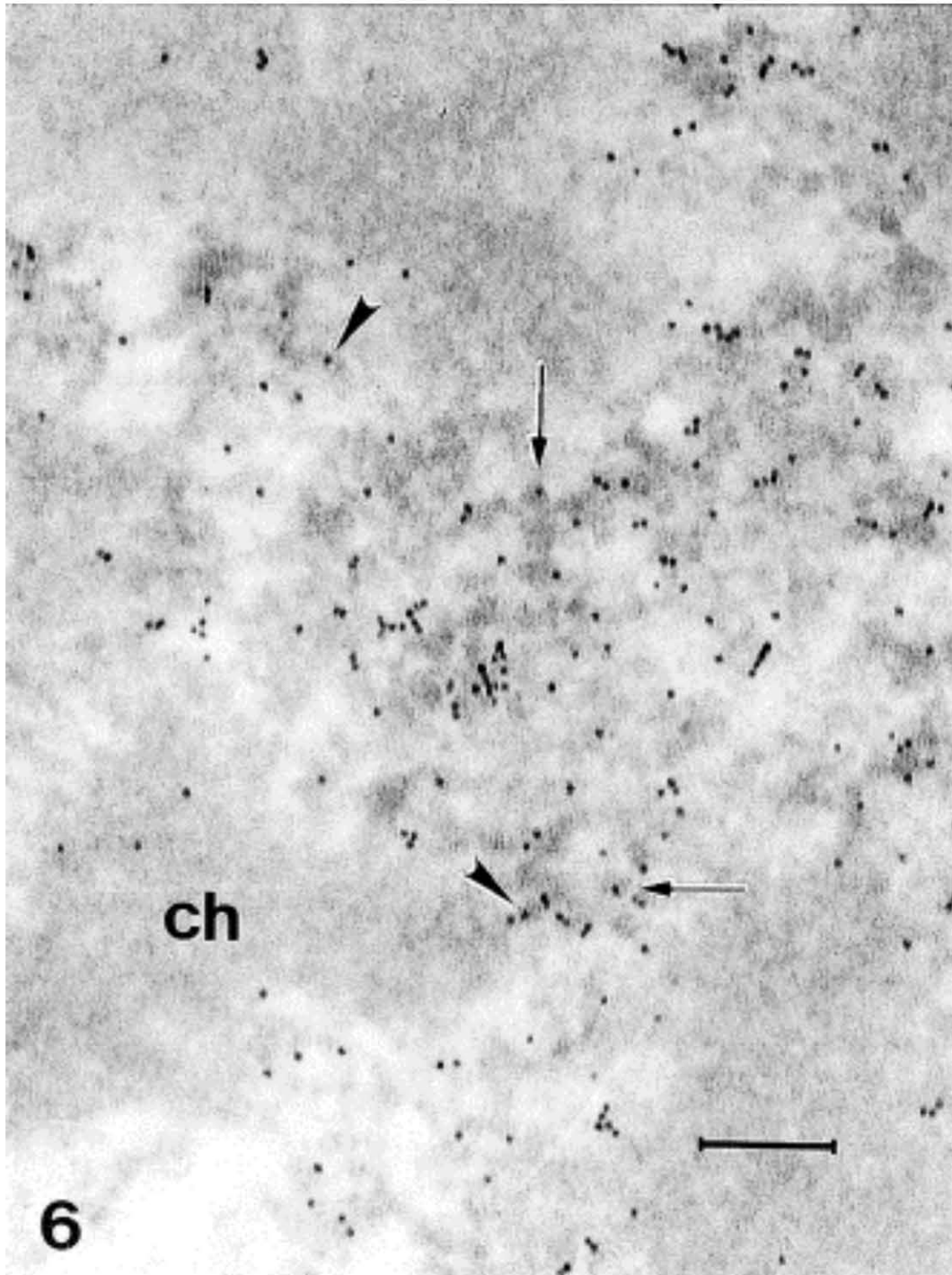


Figura 11. Localización de ARN en gránulos de *Lacandonia* en el núcleo de *Ginkgo biloba*. Después de la hibridación *in situ* se usa el ADN total como sonda y partículas de oro coloidal de 10 nm como marcador, la tinción se presenta en los gránulos de *Lacandonia* (flechas) y en fibras asociadas (puntas de flecha). Contraste de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barras 200 nm.

Tipo de núcleo en los principales grupos del reino Plantae.

Los cortes semifinos teñidos con azul de toluidina permitieron observar el arreglo de la cromatina en microscopía óptica, como es posible ver en la figura 12 (a-h) donde *Coleochaete scutata* (alga verde), *Lycopodium sp* (Lycophyta), las Monilophyta (*Psilotum complanatum*, *Equisetum sp.* y *Marattia mexicana*), *Ceratozamia* (Cycadales), *Ginkgo biloba* (Ginkgoales) y *Ephedra compacta* (Gnetales) muestran claramente un patrón reticulado, mientras que *Jatropha elbae* (dicotiledónea) tiene un arreglo cromocéntrico. Los cortes ultrafinos para microscopía electrónica convencional permitieron confirmar el arreglo de la cromatina de los ejemplares examinados, en la figura 12 (j-n) se muestra el arreglo reticulado en *Coleochaete scutata* (alga verde), las Monilophyta (*Psilotum complanatum* y *Adiantum capillus-veneris*) y *Ephedra compacta* (Gnetales), en cambio, *Jatropha elbae* (dicotiledónea) muestra un patrón cromocéntrico. Los mismos cortes ultrafinos preparados para microscopía electrónica, pero, observados a mayor aumento posibilitaron la observación de los GLs. En la figura 13 se observan en *C. scutata* (alga verde), *Lycopodium sp.* (Lycophyta), las Monilophyta (*Psilotum complanatum*, *Adiantum capillus-veneris*), *Ephedra compacta* (Gnetales) y *Lacandonia schismatica* (monocotiledónea del orden Triuridales).

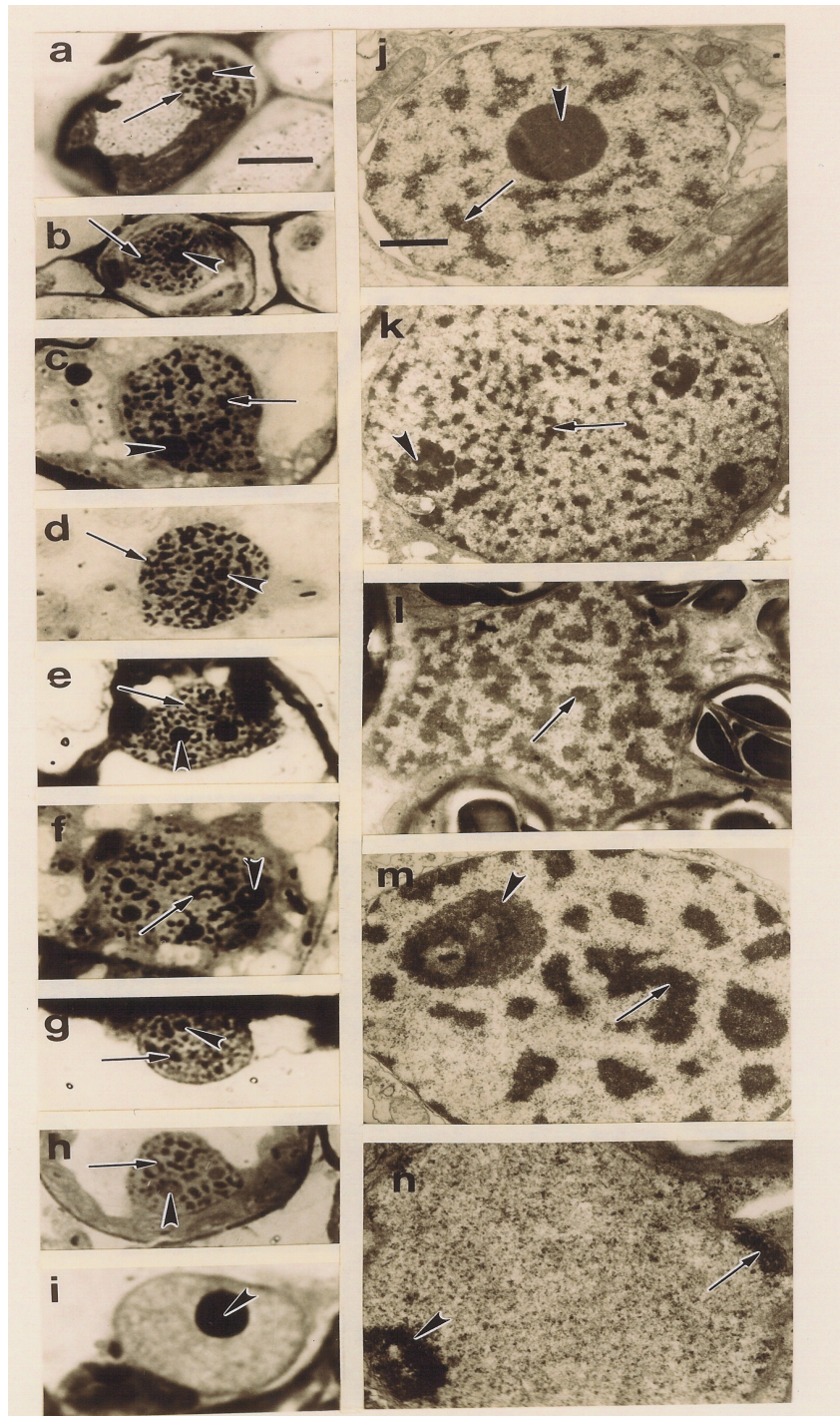


Figura 12. Microfotografías de núcleos interfásicos teñidos con azul de toluidina obtenidas en microscopio óptico. *Coleocaete scutata* (a), *Lycopodium* sp (b), *Psilotum complanatum* (c), *Equisetum* sp (d), *Marattia mexicana* (e), *Ceratozamia* (f), *Ginkgo biloba* (g), *Ephedra compacta* (h), *Jatropha elbae* (i), barra 10 μ m. Microfotografías obtenidas en el microscopio electrónico de transmisión, los cortes fueron contrastados con acetato de uranilo-citrato de plomo. *C. scutata* (j), *P. complanatum* (k), *Adiantum capillus-veneris* (l), *Ephedra compacta* (m), *Jatropha elbae* (n). Cromatina (flechas), nucléolo (cabeza de flecha). Barra 2 μ m.

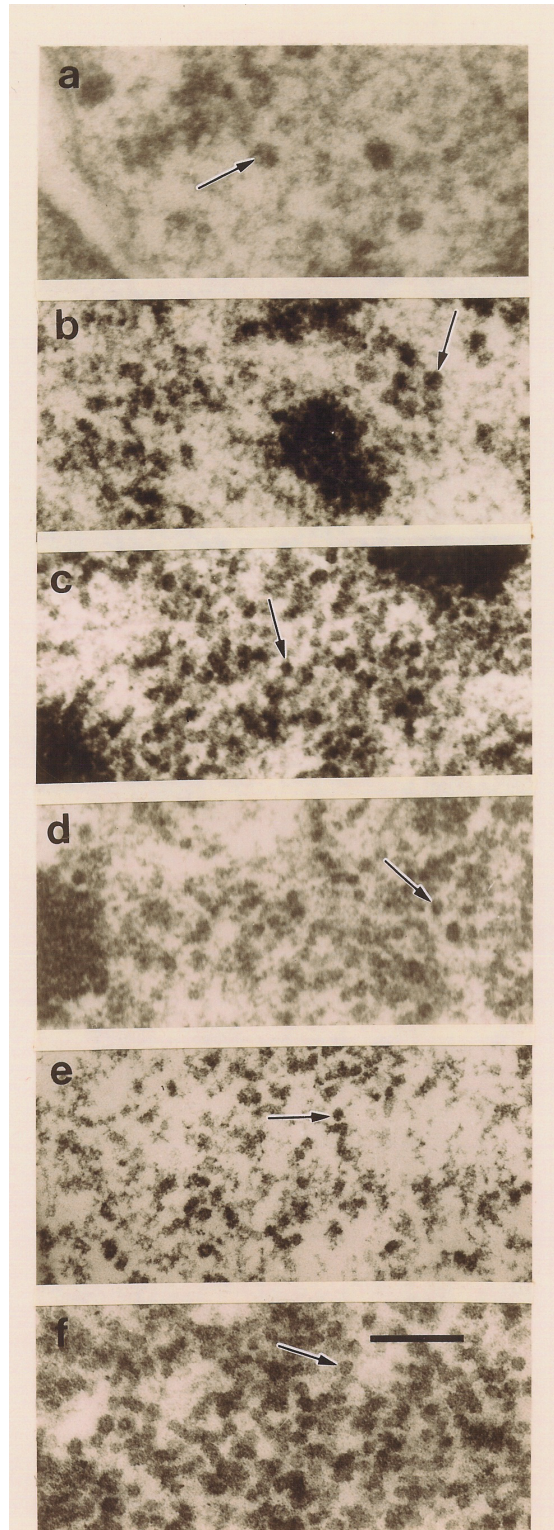


Figura 13. Microfotografías obtenidas en el microscopio electrónico de transmisión. Los cortes fueron contrastados con acetato de uranilo-citrato de plomo. *Coleochaete scutata* (a), *Psilotum complanatum* (b), *Lycopodium sp* (c), *Adiantum capillus-veneris* (d), *Ephedra compacta* (e), *Lacandonia schismatica* (f), gránulos de *Lacandonia* (flechas). Barra 200 nm.

En la tabla 1 es posible ver el tipo de cromatina y la presencia o ausencia de GLs, aunque a continuación se hace un resumen de estos resultados por grupo taxonómico.

Algas verdes. *Chlamydomonas sp*, *Klebsormidium sp*, *Chara sp*, *Nitellopsis sp* y *Zygnema sp* tienen núcleos cromocéntricos y carecen de gránulos de *Lacandonia*. *Coleochaete scutata* tiene núcleo reticulado y GLs.

Briofitas *sensu lato*. Las Marchantiophyta (hepáticas) *Monoclea sp* y *Metzgeria sp* tienen núcleos reticulados y cuentan con GLs, en cambio, *Marchantia* tiene núcleo cromocéntrico y carece de GLs. Los géneros *Anthoceros* y *Megaceros* de las Anthocerotophyta tienen núcleos cromocéntricos y carecen de GLs. En el caso de las Bryophyta (musgos) *Andraeae sp* y *Sphagnum sp* tienen núcleos reticulados y GLs, *Barbula sp* al contrario tiene núcleo cromocéntrico y carece de GLs.

Lycophyta. *Lycopodium complanatum* y *Selaginella sp*. Presentan núcleos reticulados y GLs.

Monilophyta. Todas las plantas examinadas presentan núcleos reticulados y cuentan con GLs, *Equisetum sp.*, *Psilotum complanatum*, *Adiantum capillus-veneris*, *Marsilea sp.*, *Salvinia sp.*, *Nephrolepis sp*, *Platycereum sp* y *Marattia mexicana*.

Gimnospermas. *Ginkgo biloba* (Ginkgoales), *Ceratozamia sp.* (Cycadales), *Ephedra compacta* (Gnetales) y las coníferas de los géneros *Podocarpus reichei*, *Sequoia sempervirens*, *Pinus lagunae* y *Taxodium mucronatum*, *Cupressus lusitanica* poseen núcleos reticulados y GLs.

Angiospermas. *Amborella trichocarpa* (dicotiledónea) del grupo hermano de todas las angiospermas, de acuerdo a la filogenia APGIII (2009), posee núcleo cromocéntrico y GLs, en contraste, *Illicium mexicanum* (dicotiledónea) del tercer clado de las angiospermas y *Lacandonia schismatica* y *Triuris brevistylis* (monocotiledóneas), Jiménez-García *et al* (1992) tienen núcleos reticulados y GLs. La mayoría de las monocotiledóneas estudiadas tienen núcleos reticulados y carentes de GLs, como se

vio en *Allium cepa*, *Astrocarium mexicana*, *Heliconia sp.* y *Zea mays* a excepción de *Encyclia* que tiene núcleo cromocéntrico pero también carece de GLs. Las dicotiledóneas examinadas tienen núcleo cromocéntrico sin GLs, a excepción de *Amborella trichocarpa* que tiene mismo tipo de núcleo pero con GLs e *Illicium mexicanum* que posee núcleo reticulado y GLs.

Tabla 1. Se indica el tipo de núcleo de acuerdo al arreglo de la cromatina y la presencia o ausencia de gránulos de *Lacandonia* (GLs) en los organismos estudiados. Dicotiledónea¹, Monocotiledónea^o.

Grupo	Especie	GLs	Núcleo cromocéntrico	Núcleo reticulado
Algas verdes	<i>Chlamydomonas sp</i>		x	
Algas verdes	<i>Zygnema sp</i>		x	
Algas verdes	<i>Nitellopsis sp</i>		x	
Algas verdes	<i>Chara sp</i>		x	
Algas verdes	<i>Klebsormidium sp</i>		x	
Algas verdes	<i>Coleochaete scutata</i>	x		x
Hepatophyta	<i>Monoclea sp</i>	x		x
Hepatophyta	<i>Metzgeria sp</i>	x		x
Hepatophyta	<i>Marchantia sp</i>		x	
Anthocerotophyta	<i>Anthoceros sp</i>		x	
Anthocerotophyta	<i>Megaceros sp</i>		x	
Bryophyta	<i>Barbula sp</i>		x	
Bryophyta	<i>Sphagnum sp</i>	x		x
Bryophyta	<i>Andreaea sp</i>	x		x
Lycophyta	<i>Lycopodium sp</i>	x		x
Lycophyta	<i>Selaginella sp</i>	x		x
Monilophyta	<i>Equisetum sp</i>	x		x
Monilophyta	<i>Psilotum complanatum</i>	x		x
Monilophyta	<i>Salvinia sp</i>	x		x
Monilophyta	<i>Marsilea sp</i>	x		x
Monilophyta	<i>Platycterium</i>	x		x
Monilophyta	<i>Nephrolepis</i>	x		x
Monilophyta	<i>Marattia mexicana</i>	x		x
Monilophyta	<i>Adiantum capillus-veneris</i>	x		x
Cycadales	<i>Ceratozamia</i>	x		x
Gynkgoales	<i>Ginkgo biloba</i>	x		x
Coniferales	<i>Podocarpus reichei</i>	x		x

Coniferales	<i>Cupressus lusitanica</i>	x		x
Coniferales	<i>Pinus lagunae</i>	x		x
Coniferales	<i>Taxodium mucronatum</i>	x		x
Coniferales	<i>Sequoia sempervirens</i>	x		x
Gnetales	<i>Ephedra compacta</i>	x		x
Angiosperma	<i>Amborella trichocarpa</i> ¹	x	x	
Angiosperma	<i>Nymphaea sp</i> ¹		x	
Angiosperma	<i>Illicium floridanum</i> ¹	x		x
Angiosperma	<i>Piper auritum</i> ¹		x	
Angiosperma	<i>Magnolia grandiflora</i> ¹		x	
Angiosperma	<i>Ceratophyllum sp</i> ¹		x	
Angiosperma	<i>Mathiola incana</i> ¹		x	
Angiosperma	<i>Simondsia sinensis</i> ¹		x	
Angiosperma	<i>Jatropha elbae</i> ¹		x	
Angiosperma	<i>Alnus jorullensis</i> ¹		x	
Angiosperma	<i>Peniocereus sp</i> ¹		x	
Angiosperma	<i>Senecio sp</i> ¹		x	
Angiosperma	<i>Cucumis sp</i> ¹		x	
Angiosperma	<i>Voyria sp</i> ¹		x	
Angiosperma	<i>Lycopersicum sculentum</i> ¹		x	
Angiosperma	<i>Solandra guerrerensis</i> ¹		x	
Angiosperma	<i>Encyclia sp</i> ^o		x	
Angiosperma	<i>Zea mays</i> ^o			x
Angiosperma	<i>Heliconia sp</i> ^o			x
Angiosperma	<i>Gymnosiphon sp</i> ^o			x
Angiosperma	<i>Astrocaryum mexicana</i> ^o			x
Angiosperma	<i>Lacandonia schismatica</i> ^o	x		x
Angiosperma	<i>Triuris brevistylis</i> ^o	x		x
Angiosperma	<i>Allium cepa</i> ^o			x

La gran cantidad de representantes examinados permite hacer un análisis de la evolución de los GLs utilizando la técnica de optimización, la cual consiste en ubicar a los taxa examinados en las filogenias del reino vegetal más aceptadas en este momento (Bowman, 2013; Burleigh *et al*, 2011; Lingrone *et al*, 2012; Pryer *et al*, 2004; Soltis *et al*, 2011), y señalar gráficamente en cada taxón la presencia o ausencia de gránulos en el cladograma generado.

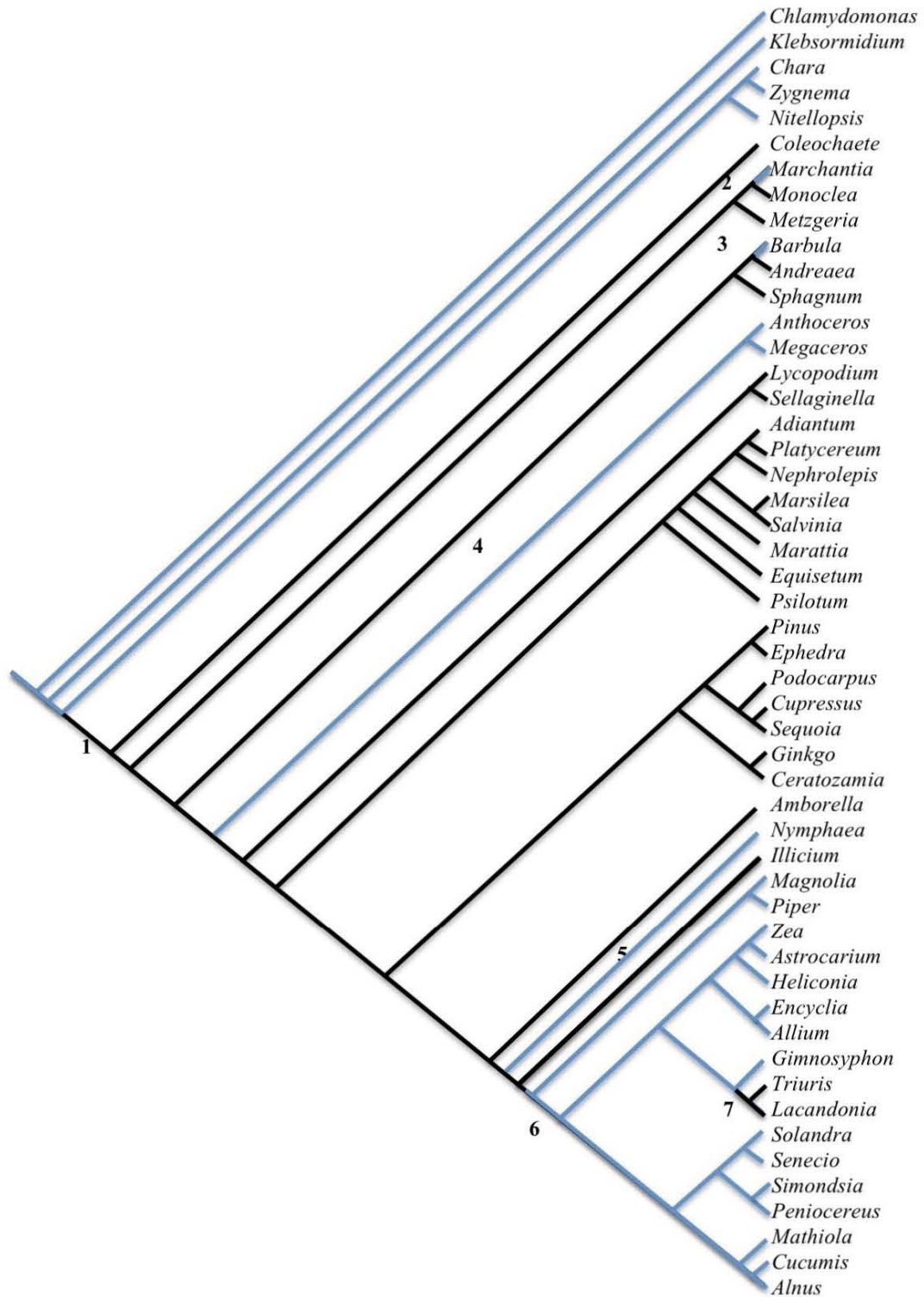


Figura 14. Cladograma de los taxa estudiados. Los clados de color negro muestran la presencia de GL y los de color azul su ausencia de GL.

El cladograma mostrado en la figura 14, evidencia que *Coleochaete*, la mayoría de los grupos primitivos Marchantiophyta, Briophyta *sensu stricto* Magnoliophyta (*Amborella* e *Illicium*), además de *Lacandonia* y *Triuris* poseen GLs, en cambio, el resto de las algas verdes, los Anthocerotophyta, los grupos no primitivos (derivados) de Marchantiophyta y Briophyta *sensu stricto*, además de la gran mayoría de las dicotiledóneas y monocotiledóneas carecen de GLs. *Coleochaete* y la mayoría de los grupos primitivos, las monocotiledóneas y algunas dicotiledóneas tienen cromatina reticulada, el resto de las algas estudiadas, las Anthocerotophyta, los grupos no primitivos de las hepáticas y los musgos, además la mayoría de las dicotiledóneas poseen núcleos cromocéntricos. En general los grupos que poseen cromatina reticulada poseen GLs (excepto las monocotiledóneas, aunque *Lacandonia* y *Triuris* si poseen GLs), y los que tienen cromatina cromocéntrica carecen de GLs (excepto *Amborella* que si los presenta).

Es claro que la única alga verde con ultraestructura nuclear semejante a la de los grupos vegetales primitivos es *Coleochaete scutata* (cambio 1 en el cladograma, figura 14). Esta especie pertenece al género que muchas filogenias modernas ubican como grupo hermano del reino Plantae (Finet et al, 2012). En la siguiente rama todos los géneros primitivos de hepáticas, *Metzgeria* y *Monoclea*, tienen cromatina reticulada y GLs, pero los grupos no primitivos como *Marchantia* sufren una reversión a cromatina cromocéntrica y ausencia de GLs (cambio 2 en el cladograma, figura 14). Los musgos están ubicados en el siguiente clado y 2 géneros, *Sphagnum* y *Andreaea*, tienen cromatina reticulada y GLs, aunque un tercero, *Barbula*, sufre reversión a cromatina cromocéntrica y ausencia de GLs (cambio 3 del cladograma, figura 14). Esta misma reversión existe en Anthocerotophyta, *Megaceros* y *Anthoceros* (cambio 4 del cladograma, figura 14). Las siguientes ramas que agrupan a Lycophyta, helechos (Monilophyta) y las gimnospermas tienen cromatina reticulada y GLs. En la primera rama de las angiospermas, *Amborella trichocarpa* tiene cromatina cromocéntrica y GLs, la segunda tiene a *Nymphaea sp.* con núcleo cromocéntrico y sin GLs (reversión 5 del cladograma, figura 14), todo el resto de las dicotiledóneas y gran parte de las monocotiledóneas carecen de GLs (ver cambio 6 en el cladograma, figura 14), pero las primeras tienen núcleos cromocéntricos y las segundas tienen núcleo reticulado

(excepto *Encyclia sp.*). La única reversión en este grupo se da en las Triuridales (*Lacandonia schismatica* y *Triuris brevistylis*) que presentan cromatina reticulada y GLs (ver cambio 7 del cladograma, figura 14).

DISCUSIÓN

A. GINKGO BILOBA

Núcleos reticulados

El núcleo de *Ginkgo biloba* es reticulado, como lo muestran las bandas observadas en el microscopio óptico en cortes semifinos teñidos con azul de toluidina, en el microscopio electrónico con cortes ultrafinos contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo y en el microscopio de fuerza atómica en cortes semifinos. Aunque, la confirmación ultraestructural de que las bandas corresponden a cromatina proviene de las pruebas de inmunolocalización ultraestructural del DNA y RNA, pues resultaron fuertemente marcadas cuando se usó anticuerpo anti-DNA, en cambio, ninguna fue vista cuando se hizo la prueba de detección de RNA a través de la hibridación *in situ* con DNA total de *G. biloba*.

La organización reticulada del núcleo vegetal ha sido documentada en varias especies como *Allium cepa* y *A. porrum* (Lafontaine,1974), *Lacandonia schismatica* y *Triuris brevistylis* (Jiménez-García,1992), aunque únicamente las dos últimas poseen GLs.

Gránulos de *Lacandonia*

El uso de tres clases de evidencia demuestran la presencia de GLs en el núcleo de *G. biloba*, en primer lugar la observación de cortes finos contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo en microscopio electrónico de transmisión permitió detectar gránulos de 32 nm en los espacios intercromatiniano y pericromatiniano, ultraestructura descrita por Jiménez-García *et al.* (1992) en *Lacandonia schismatica*. En segundo lugar, estas partículas fueron claramente visibles mediante la técnica regresiva de EDTA para la detección preferencial de RNPs. En tercer lugar, las partículas resultaron

marcadas en la prueba de detección de ARN mediante el protocolo de ADN total (López-Velázquez *et al*, 1998; Agredano-Moreno y Jiménez-García, 2000).

En diversos trabajos se ha propuesto que los GLs son equivalentes a los gránulos pericromatinianos y a los gránulos de los anillos de Balbiani (Agredano-Moreno y Jiménez-García, 2000), debido a que son detectados en el espacio pericromatiniano con el anticuerpo para snRNPs (Agredano-Moreno *et al*, 1994), y porque el número de GLs tiene variaciones durante el desarrollo de la flor de *Lacandonia schismatica* (Agredano-Moreno y Jiménez-García, 2000), de manera similar a lo que ocurre en el desarrollo de los animales (Vázquez Nin y Echeverría, 1996), además, contienen proteínas SR como los gránulos de los anillos de Balbiani. La distribución de los GLs en los espacios intercromatiniano y pericromatiniano, la presencia de poli(A)+RNA y proteínas SR sugieren su equivalencia con los gránulos pericromatinianos los cuales presentan los dos últimos componentes.

Gránulos Intercromatinianos

La ultraestructura del núcleo cromocéntrico ha sido descrita con detalle en el jitomate (Moreno Díaz de la Espina, 1992; Vázquez Nin *et al*, 1992), en *Chirantodendron pentadactylon* (Echeverría *et al*, 1999), en tabaco y *Arabidopsis* (Docquier *et al*, 2004; Fang *et al*, 2004) y su organización difiere de los núcleos reticulados con GLs en dos puntos, en primer lugar cantidad y distribución de la cromatina (son NC) y en segundo lugar, aparentemente poseen gránulos intercromatinianos (GICs). Sin embargo, Docquier *et al*, (2004) señalan que la presencia de gránulos intercromatinianos en células vegetales todavía es materia de debate y agrega que nunca se ha visto claramente a través del microscopio electrónico, una organización de gránulos intercromatinianos semejante a la observada en el núcleo de los mamíferos, aunque en su trabajo, entre otros se registra la presencia de pequeños cúmulos de partículas de 20-30 nm. En el presente trabajo no se hallaron este tipo de partículas en los núcleos examinados, lo que tal vez signifique que la maduración del ARN pre-mensajero es

diferente, al menos ultraestructuralmente, en los núcleos reticulados respecto a los núcleos cromocéntricos.

B. Distribución de los gránulos de *Lacandonia* y del núcleo reticulado en el reino Plantae

La ubicación del tipo de núcleo en cada grupo taxonómico en la filogenia más aceptada del reino Plantae, mediante la técnica de optimización permite afirmar que la mayoría de los grupos vegetales basales, desde briofitas hasta gimnospermas, poseen núcleo reticulado y GLs, a excepción de Anthocerotophyta y los géneros no primitivos (derivados) de las briofitas. Además, resalta el hecho de que la aparición del núcleo reticulado con GLs no surge en el reino vegetal sino en uno de los géneros de algas verdes, *Coleochaete*, que se ha postulado (en cladogramas morfológicos y moleculares) como posible grupo hermano de las plantas (Finet et al, 2012). *Chara*, el otro género de alga verde propuesto como posible grupo hermano de los vegetales, posee células multinucleadas, núcleos cromocéntricos y carece de GLs por lo que parece una opción poco viable a luz de los resultados del presente trabajo.

Existen reversiones del núcleo reticulado con GLs a cromocéntrico sin GLs, tanto en las Anthocerotophyta como en los géneros no primitivos de hepáticas (*Marchantia*) y musgos (*Barbula*), en cambio, en las pteridofitas y las gimnospermas no existe reversión alguna. En las angiospermas estudiadas, *Amborella* (la primera rama de las angiospermas) tiene núcleo cromocéntrico con GLs, situación interesante pues esto hace suponer que las gimnospermas que dieron origen a las angiospermas, sufrieron una disminución muy significativa de su contenido de ADN de tal modo que las primeras plantas con flores pudieron tener núcleo cromocéntrico y GLs como ahora se observa en *Amborella*. En contraste, el segundo clado de las angiospermas, al que pertenece *Nymphaea*, el núcleo es cromocéntrico sin GLs como sucede en la mayoría de las plantas con flores.

El tercer clado de las angiospermas lo ocupa *Illicium* que tiene cromatina reticulada y GLs. En el cuarto clado todos los grupos carecen de GLs, excepto *Lacandonia* y *Triuris* (reversión 7) y todas las ramas subsecuentes también carecen de GLs. En general, las monocotiledóneas presentan cromatina reticulada y las dicotiledóneas cromocéntrica, tal como lo propuso Nagl (1985), quien encontró de manera implícita (al graficar contenido de ADN contra tipo de núcleo) que las dicotiledóneas con valores bajos de DNA (1C= 5 pg o menos) tenían núcleos cromocéntricos y las monocotiledóneas con valores altos (12.5-25 pg) presentaban núcleos reticulados, sin embargo, incluye en el último tipo de núcleo a una dicotiledónea de alto contenido (45 pg).

C. Algunas ideas sobre la relación entre el contenido de ADN y diversificación de las plantas.

Las angiospermas poseen en general poco contenido de ADN. Soltis *et al.* (2003), señalan que la moda es de 0.6 pg (1C) como se desprende de un análisis estadístico de las 3543 especies de las que se tienen datos. Atendiendo a esta información, es obvio que la mayoría de las angiospermas tienen núcleos cromocéntricos y los núcleos reticulados existen en algunos pocos grupos como en las monocotiledóneas (con algunas excepciones) y en algunas de dicotiledóneas (como las Santanales).

En una perspectiva evolutiva, la ultraestructura cromocéntrica hallada en los dos clados más primitivos de las angiospermas, representadas en el presente estudio, por *Amborella* y *Nymphaea*, coinciden plenamente con la propuesta de Soltis *et al.* (2003), de que las angiospermas primitivas tienen contenidos de DNA muy bajos (0.87 pg en *Amborella* y de 0.6-1.1 pg en dos especies de *Nymphaea*). Paradójicamente, el grupo ancestral de las angiospermas, las gimnospermas tienen, en su contenido de ADN, una moda de 15.8 pg y una media de 14.71 pg (Leich *et al.*, 1998; Soltis *et al.*, 2003), aunque de manera excepcional, *Gnetum* posee un contenido de ADN relativamente bajo (entre 2.25 y 4.02 pg), (Leich *et al.*, 2001), de manera que es muy probable que tenga núcleo cromocéntrico. Este bajo contenido de ADN de *Gnetum* es congruente con las primeras filogenias moleculares (Friedman y Charnichael, 1996), donde se consideraba a las

gnetales como grupo hermano de las angiospermas, en abierto contraste con las filogenias aceptadas en la actualidad, donde todas las gimnospermas son el grupo hermano de las angiospermas, sin distinguir un grupo en particular. Pero, vale la pena recalcar que *Gnetum* es el único género de gimnosperma con hojas reticuladas como se les encuentra en las dicotiledóneas, hecho que ha provocado que muchos autores lo hallan ligado al origen de las angiospermas.

El bajo contenido de ADN en las plantas con flores les permite que sus plántulas se establezcan rápidamente, reducir el tiempo de vida de cada generación, disminuir el costo de la reproducción (al sintetizar menos ADN) e incrementar la tasa reproductiva, de acuerdo a Bennett (1972) y Midgley y Bond (1991), de modo que esta propiedad se convirtió en una ventaja competitiva frente a las gimnospermas (Leitch *et al*, 2005). La propuesta surge del hecho de que la mitosis y la meiosis tienen una duración mayor conforme aumenta el contenido de ADN, pues Evans y Rees (1971) describen que el incremento del ciclo mitótico aumenta 0.38 horas por cada pg y Bennett (1971,1977) encuentra que *Petunia x* con 1.9 pg tiene un ciclo mitótico de 18 horas y en *Trillium erectum* con 40 pg el ciclo dura 274 horas. El bajo contenido de ADN les dio a las angiospermas una gran flexibilidad evolutiva, según Bennett y Leitch (2000), propuesta apoyada por los resultados de Knight *et al* (2005), quienes hallan que las especies con alto contenido de ADN tienen un ciclo celular más largo, tasas de crecimiento y fotosintética menores a las de las especies con poco contenido de ADN, además de tener, según Vinogradov (2003), menos especies por género, es decir, poseen menor capacidad de diversificación. Knight *et al* (2005) establecen que las especies por ellos estudiadas con menor contenido de ADN ocupan amplias condiciones ambientales, mientras que las de altos contenidos tienen hábitats más restringidos. Pero, aquí hace falta hacer una observación desde otra perspectiva, pues es bien sabido que en muchos casos las angiospermas poliploídes pueden sobrevivir en condiciones más difíciles que sus parientes diploides, por ejemplo, *Jatropha elbae* un árbol diploide que tiene núcleo cromocéntrico tal como se ve en la figura 12 (i,n), habita en bosque tropical caducifolio de la Cuenca del río Balsas, mientras que un arbusto rizomatoso tetraploide, *Jatropha dioica*, con morfología idéntica a la especie ya mencionada prospera en las

zonas áridas del desierto chihuahuense, por lo que deben examinarse con cuidado a los dos fenómenos mencionados para entender como es posible llegar a conclusiones contradictorias.

Al hacer un análisis de contenido de ADN y diversidad de los grupos con semilla, es evidente que las gimnospermas tienen pocos géneros y especies (alrededor de 900-1200 especies en la actualidad) y un alto contenido de ADN (un promedio de 17.56 pg y una moda 15.8 pg, de acuerdo a (Leich *et al*, 1998; Soltis *et al*, 2003), en cambio, las angiospermas tienen miles de géneros y alrededor de 272 000 especies con bajo contenido de ADN (un promedio de 6. 2 pg y una moda de 0.6 pg (Leicht *et al*, 2010), de manera que parece ser cierto que el bajo contenido de ADN ha contribuido al éxito evolutivo y ecológico del último grupo, aunque no es posible validar certeramente esta afirmación pues el número de ventajas adaptativas de las plantas con flores puede referirse a cambios cualitativos (genéticos) y no necesariamente a un cambio cuantitativo de ADN (duplicación de cromosomas o acumulación de retroelementos). Afortunadamente, al interior de las angiospermas es posible establecer el mismo tipo de comparación sin la desventaja descrita, las dicotiledóneas tienen 220,000 especies y su contenido es 2.9 pg en promedio, en contraste, las monocotiledóneas tienen 52,000 especies y su contenido promedio es de 11 pg (Leitch *et al*, 2010), es decir, las dicotiledóneas tienen 4 veces más diversidad que las monocotiledóneas y poseen aproximadamente 1/4 del contenido de ADN de este último grupo, por lo que las ventajas evolutivas de presentar poco ADN parecen ser verdaderas.

El contenido de ADN parece incidir en la capacidad de reparar el rompimiento de las dos bandas de ADN (DSBs, double strand break), un fenómeno muy estudiado en los seres humanos pues es producido por radiaciones, sustancias químicas o espontáneamente y puede desembocar en cáncer y otras enfermedades graves. Kirik *et al* (2000) encuentran experimentalmente que *Arabidopsis thaliana* (con 0.2 pg) no es capaz de reparar DSBs inducidos por la endonucleasa de restricción I-SCel, en cambio, en el tabaco (con 4.4 pg) el 40% de las deleciones fueron acompañadas de inserciones, además, las deleciones de la primera especie fueron con frecuencia de mayor tamaño.

En animales existen fenómenos semejantes, Bensasson *et al* (2001) encuentran que existe una correlación entre el contenido de ADN y la frecuencia y el tamaño de las deleciones, así *Drosophila* (con 0.179 pg), *Laupala* (grillo de Hawaii con 1.94 pg) y *Podisma* (saltamontes acridido con 18.52 pg) muestran (figura 15?) que el tamaño y la frecuencia de las deleciones halladas en 57 pseudogenes de origen mitocondrial es mayor conforme se tiene menor contenido de ADN. Desde esta perspectiva ¿Por qué existen más especies de angiospermas con bajo contenido y menos especies con alto contenido de ADN? Tal vez la hipótesis de Bennett (1987) de que las angiospermas han tenido mayor flexibilidad evolutiva por tener menor contenido de ADN, pueda ser cierta (en el caso de las dicotiledóneas) si el menor contenido da la posibilidad de que se tengan más cambios genéticos, como se desprende del trabajo de Kirik *et al* (2000) dado que presentan elevada sensibilidad a factores externos, aunado a la mayor velocidad de división celular, tasas de crecimiento y fotosintética mayores, además de una replicación más económica del material genético. Las monocotiledóneas, en cambio, tal vez tengan menor posibilidad de alteración de su material genético porque sus mecanismos de restauración son más eficientes Y por lo tanto tengan una menor variabilidad genética y/o un menor número de mutaciones.

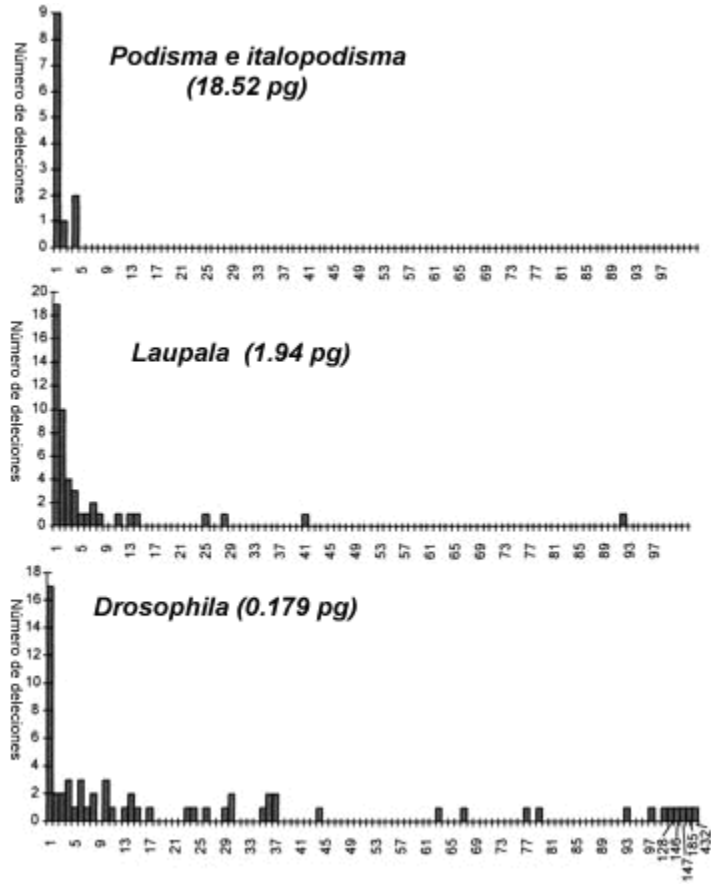


Figura 15. Distribución de frecuencias de los tamaños de deleción en *Podisma*, *ItaloPodisma*, *Laupala* y *Drosophila melanogaster* (modificado de Bensasson *et al*, 2001).

D. ¿El contenido de ADN y la presencia de gránulos de *Lacandonia* tiene alguna relación con la invasión al medio terrestre?

En el mismo tenor de la discusión anterior, es interesante recordar que *Coleochaete* es la única alga verde con alto contenido de ADN (2N:1.4-5pg [Kapraun, 2007]), como lo demuestra el hecho de presentar núcleo reticulado, de modo que es posible especular que tiene una resistencia mayor a los daños producidos por la radiación solar (en particular la luz UV), de manera que tal vez sea una condición importante para invadir el medio terrestre donde las plantas primitivas carecían del efecto protector del agua de modo permanente debido a que vivían pantanos y sitios de inundación periódica. Es

necesario aclarar que *Chara* tiene un contenido de alrededor de 10 pg por cada célula, pero, como cada una de ellas tiene miles de núcleos cromocéntricos y sin GLs, el contenido es la suma del total de ellos. Es claro que desde la perspectiva del contenido de ADN, *Coleochaete* parece una mejor opción como grupo hermano de las plantas que *Chara*, sobre todo si no es fácil explicar como un grupo cuyas células tienen miles de núcleos evolucionaron para originar a las plantas que tienen generalmente un solo núcleo por célula.

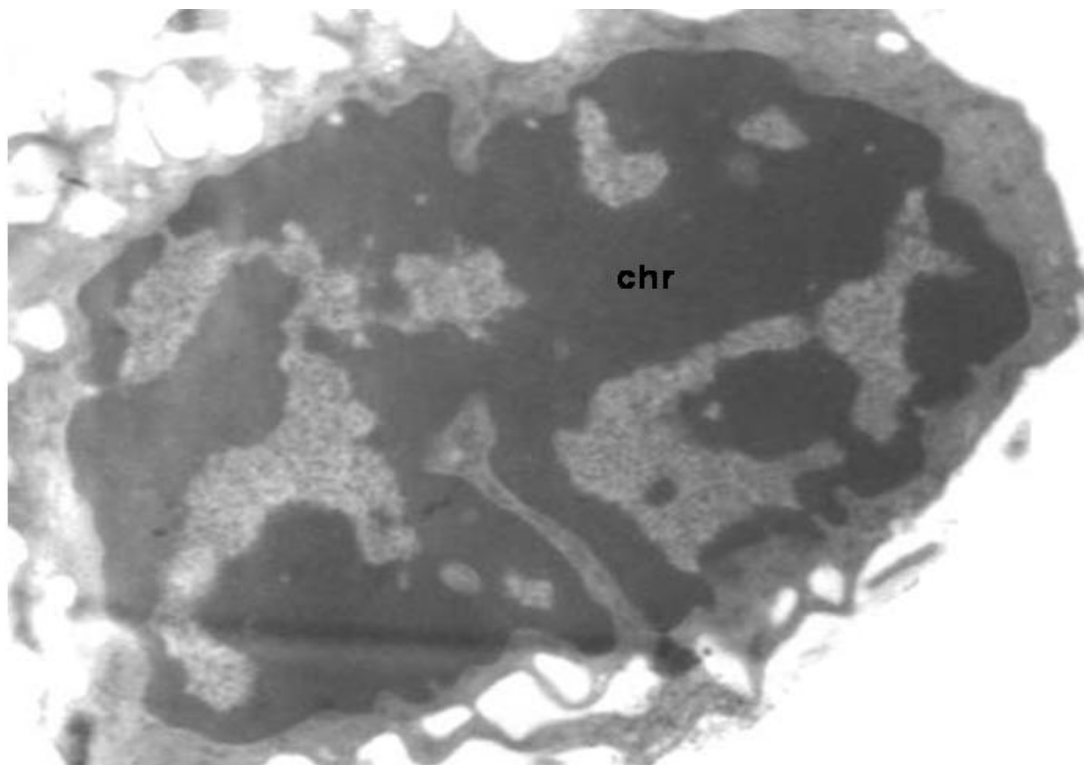
El contenido de ADN, parece importante en la invasión al medio terrestre, pues, al igual que *Coleochaete*, los peces pulmonados (considerados el grupo hermano de los anfibios) poseen un alto contenido (entre 53 y 133 pg, Gregory, 2001) y pueden estar expuestos a la atmósfera, además, los anfibios también poseen cifras importantes de ADN, 16.2 pg en promedio, de acuerdo a Gregory (2001). A partir de los resultados observados en *Coleochaete* y los grupos vegetales primitivos, donde el alto contenido de ADN parece estar ligado a núcleos con cromatina reticulada y a la presencia de GLs, se decidió observar (figuras 15 y 16) a los núcleos de una especie de ajolote (*Ambystoma rivulare*), los que sorprendentemente presentaron cromatina reticulada y cúmulos de gránulos similares en distribución, cantidad y tamaño a los GLs de los núcleos de *G. biloba* y *L. schismatica*, algo nunca registrado en animales, ya que el núcleo canónico de estos es cromocéntrico y con GPCs y GICs. Entonces ¿En las plantas y en los anfibios el alto contenido de ADN y la presencia de gránulos de Lacandonia o gránulos parecidos a estos indican una evolución celular paralela frente a presiones de selección semejantes?

Vale la pena aclarar que Thompson y Muraszko (1978), estimaron que peces pulmonados y anfibios fósiles tenían entre 5 y 10 pg de ADN (mediante la medición de las lagunas de los osteocitos de los huesos fósiles), de modo que los altos contenidos de ADN de los representantes modernos de los grupos mencionados son producto de una historia evolutiva más reciente. Sin embargo, estos datos no invalidan la argumentación sobre la importancia de altos contenidos de ADN en la invasión del medio terrestre por parte de los vertebrados, pues los contenidos de ADN (5-10 pg) de

los fósiles de peces pulmonados y anfibios son sensiblemente mayores a los promedios registrados en los reptiles (2.24 pg), aves (1.38) y mamíferos (3.37 pg) modernos. Además, el núcleo reticulado aparentemente se forma rebasando los 5 pg, de modo que casi todos los fósiles mencionados poseían este tipo de núcleo y con ello tal vez gránulos parecidos a los GLs como *Ambystoma rivulare*, ver figura 16 y 17.

La polémica sobre el contenido de ADN en los primeros anfibios sigue hasta la fecha, por ejemplo, Organ *et al* (2011) obtienen dos valores para fósiles de anfibios, sí siguen un modelo estadístico general sus valores oscilan entre 3.03 y 3.69 pg, pero, sí usan un modelo estadístico basado en los anfibios sus valores para los mismos fósiles están entre 3.96 y 9.83 pg. Por ejemplo, *Diplocaulus* del Pérmico inferior (medido por Thompson y Muraszco, 1978) tiene 17.6 pg, asumiendo que era diploide, el valor haploide es de 8.8 pg, número cercano a los 8.77 pg registrado por Organ *et al* (2011).

Figura 16. Microfotografía de núcleo de *Ambystoma rivulare*, obtenida en microscopio electrónico de transmisión. Los cortes fueron contrastados con acetato de uranilo –citrate de plomo. Cromatina (chr), 8000x



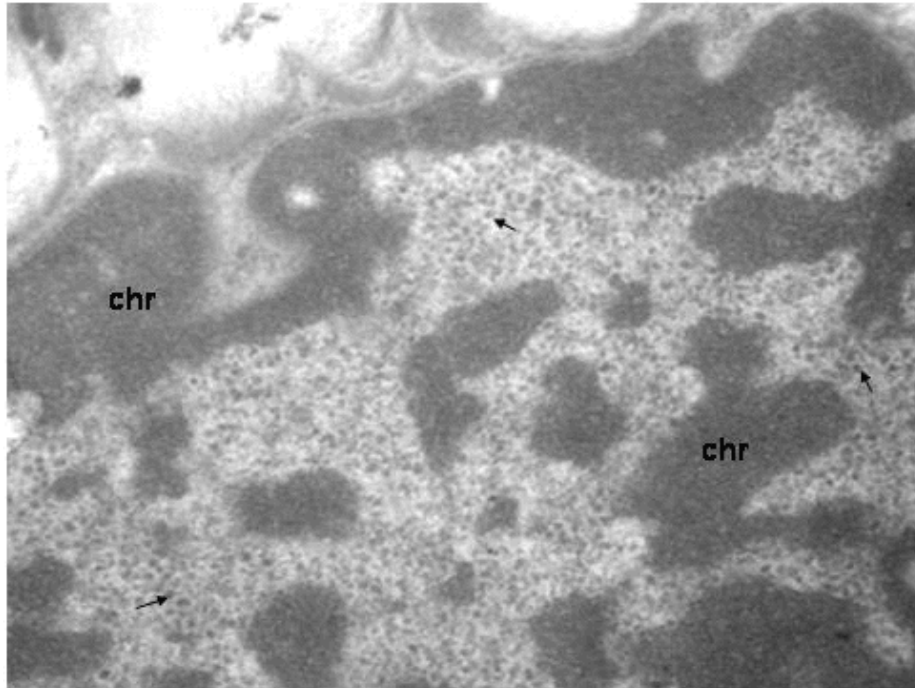


Figura 17. Microfotografía de núcleo de *Ambystoma rivulare*, obtenida en microscopio electrónico de transmisión, los cortes fueron contrastados con acetato de uranilo-citrato de plomo. Cromatina (chr), gránulos (flecha) 20,000x.

La evolución de los tetrápodos y de las plantas vasculares aparentemente no tienen nada en común porque se trata de grupos remotamente relacionados, pero al invadir el medio terrestre han compartido durante más de 370 millones de años un mismo ambiente, coincidentemente ambos grupos tienen ancestros con alto contenido de ADN y con ello núcleos reticulados y con RNPs semejantes a los GLs, pero comparten otro carácter, sus clados más exitosos poseen núcleos cromocéntricos con RNPs diferentes a los GLs, es decir tienen bajos contenidos de ADN.

El otro grupo que invadió el medio terrestre, los insectos, parecerían contradecir lo expuesto en los últimos párrafos, pues surgieron antes que los anfibios y presentan un bajo contenido de ADN (un promedio máximo de 1.2 pg), sin embargo, el hecho de

poseer un exoesqueleto de quitina les da una protección excepcional en contra de la radiación solar y de las condiciones variables de la atmósfera terrestre, de modo que no requirieron altos contenidos de ADN. Además, es el grupo terrestre más diverso (posee millones de especies), de tasa reproductiva muy alta y ciclo de vida corto, de manera que se ajustan a la hipótesis de Bennett (1987) sobre la diversificación de las angiospermas. Los acrididae (Orthoptera), langostas terrestres, son el único grupo de insectos con alto contenido de ADN (9.6 pg en promedio), de manera que es interesante conocer el arreglo de la cromatina y de los gránulos de RNPs de su núcleo. En la figura 18 se muestra el núcleo reticulado de *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Acrididae) teñido con DAPII, y dicha especie forma en la Isla Socorro agregados de miles de individuos denominados mangas con un apetito voraz y un metabolismo acelerado, simulando a pequeña escala a las plagas devastadoras del continente africano, ya conocidas desde los relatos bíblicos. ¿El alto contenido de ADN estará asociada a gránulos de Balbiani como en los cromosomas politenicos de *Chironomus*? Estos datos preliminares parecen corroborar que algunos grupos primitivos de animales y de plantas con alto contenido de ADN tienen alta probabilidad de presentar numerosos gránulos de RNPs parecidos a los GLs, lo que tal vez indique que estos núcleos tienen o pueden tener alta actividad transcripcional. Aunque, existen dos casos que no concuerdan con esta propuesta, en *Amborella* hay GLs a pesar de tener núcleo cromocéntrico y bajo contenido de ADN (0.87 pg) y en las monocotiledóneas con núcleos reticulados están ausentes los GLs (a excepción de *Lacandonia* y *Triuris*), aunque es claro que estas discordancias se dan únicamente en las angiospermas y nunca en los grupos vegetales primitivos. La presencia de GLs en *Amborella* puede deberse a que sus ancestros gimnospermicos los poseían, hipótesis nada aventurada pues el género es el grupo hermano de todas las angiospermas. La ultraestructura reticulada con GLs de *Lacandonia* y *Triuris* es más difícil de explicar, pues están ubicados en el quinto clado de la filogenia de las angiospermas, para entenderlo es necesario hacer una exploración de la ultraestructura del núcleo en los grupos basales de los clados previos (Nymphaeales, Magnoliidae) al de la monocotiledóneas, aunque en uno de ellos (Austrobaileyales) ya se encontró núcleo reticulado con GLs (*Illicium*).

El problema ahora es saber si los gránulos han surgido mediante una evolución paralela o existen desde los eucariontes más primitivos, para ello es necesario conocer los componentes que constituyen a los gránulos tanto en los vegetales como en los animales y hacer una exploración de la ultraestructura del núcleo de los eucariontes primitivos.

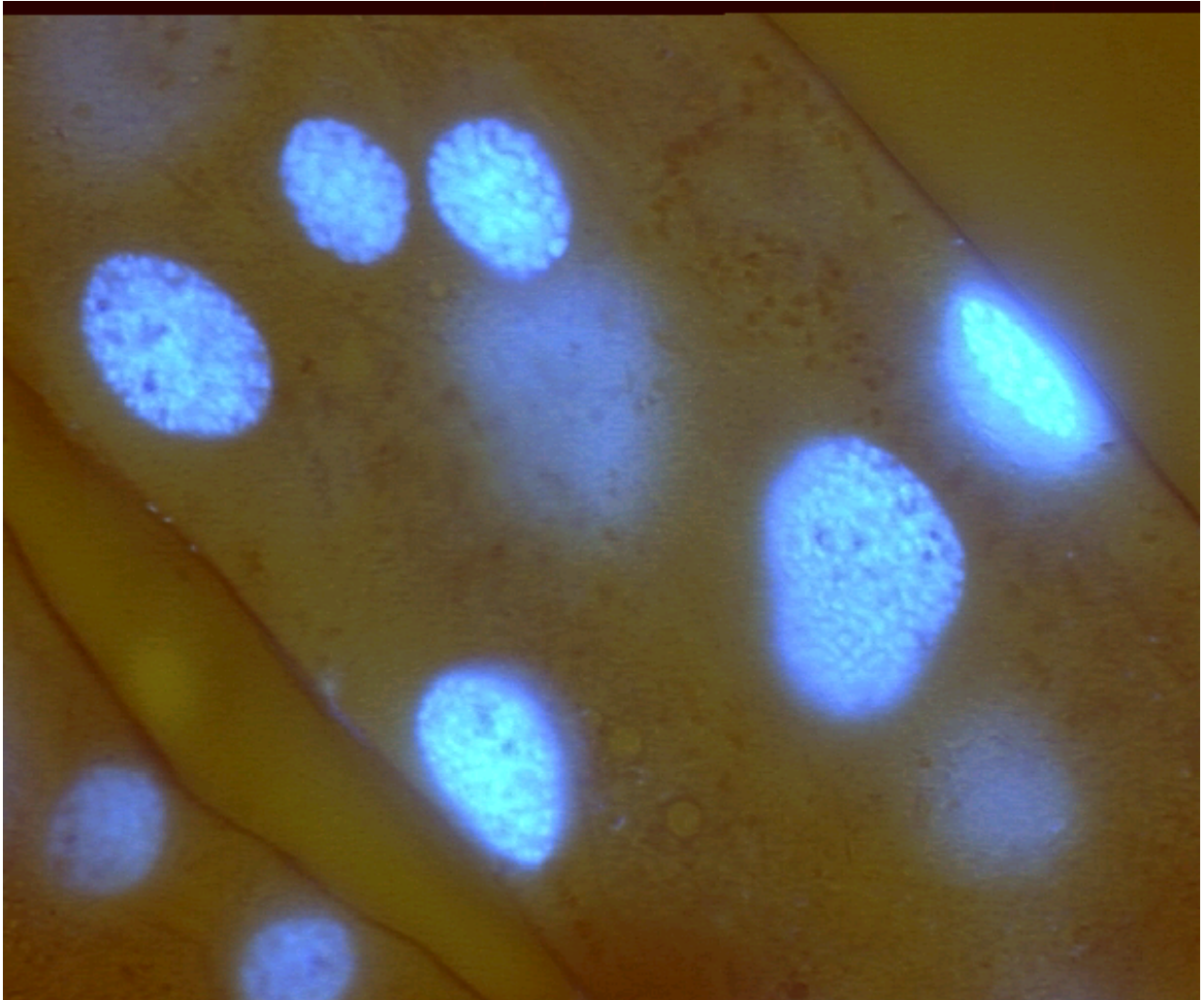


Figura 18. Núcleos de *Schistocerca piceifrons piceifrons* teñidos con DAPI. 100x,

CONCLUSIONES

1.- El núcleo interfásico de *Ginkgo biloba* tiene una ultraestructura homóloga a la de *Lacandonia schismatica* y *Triuris brevistylis*.

2.- El núcleo reticulado y con GLs es típico de los grupos primitivos de vegetales (desde Hepatophyta hasta gimnospermas), a excepción de las Anthocerotophyta y de los grupos no primitivos (derivados) de Hepatophyta y Bryophyta.

3.- El núcleo reticulado y con GLs observado en *Coleochaete* es un hecho que apoya su postulación como grupo hermano del reino Plantae.

4.- El primer clado de la filogenia de las angiospermas representado por *Amborella* posee núcleo cromocéntrico y GLs, lo que constituye una paradoja, ya que comparte la presencia de GLs con las gimnospermas y tiene cromatina cromocéntrica como la mayoría de las angiospermas.

5.- La mayoría de las angiospermas examinadas tiene núcleo cromocéntrico y carece de GLs y un grupo minoritario tiene el núcleo reticulado y sin GLs, a excepción de *Illicium floridanum* y las Triuridales (entre las que se encuentra *L. schismatica*).

6.- Aparentemente el contenido de ADN y la diversificación de las angiospermas tiene una correlación, a mayor contenido menor capacidad de diversificación y viceversa, a menor contenido mayor capacidad de diversificación. Lo que parece contradictorio con el hecho de que la poliploidía en muchas angiospermas les permite tener mayor éxito ecológico, pero dado que muchas veces este fenómeno se presenta en especies con bajo contenido de ADN (ver el caso de *Jatropha elbae* y *J. dioica* en la página 36), el incremento del material genético no implica que tales especies tengan siempre altos contenidos de ADN. Sin embargo, será necesario revisar caso por caso de poliploidía y contenido de ADN para entender cuando y de que manera es cierta la primera hipótesis mencionada.

7.- El reducido número de especies de gimnospermas actual (900-1200) e histórico (aproximadamente 2000 especies en 300 millones de años) podría explicarse, en parte, por su alto contenido de ADN.

8.- El alto contenido de ADN parece determinar en plantas y animales una ultraestructura nuclear semejante, donde la cromatina asume una distribución reticulada con abundantes gránulos de RNPs parecidos a los GLs. Con excepciones en las angiospermas (la dicotiledónea *Amborella* tiene núcleo cromocéntrico con GLs, y en las monocotiledóneas tienen núcleo reticulado sin GLs, a excepción de *Lacandonia* y *Triuris*).

LITERATURA CITADA

The angiosperm phylogeny group. 2009. An update of the angiosperm phylogeny group classification for orders and families of flowering plants: APG III. Bot. J. Linn. Soc. 161:105-121.

Agredano-Moreno, L.T. 2001. Los gránulos de *Lacandonia*. Caracterización por medio de inmunolocalización e hibridación *in situ* ultraestructural y aislamiento de una fracción enriquecida en gránulos. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias, UNAM. 78 págs.

Agredano-Moreno, L.T. y Jiménez-García, L.F. 2000. New evidence that *Lacandonia* granules are ultrastructurally related to perichromatin and Balbiani ring granules. Biol. Cell 92: 71-78.

Bennett, M.D. 1971. The duration of meiosis. Proc. R. Soc. Lond. B.178: 277-299

Bennett, M.D.1972. Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. Proc. R. Soc. Lond. B. 181: 109-135.

Bennett, M.D. 1977. The time and duration of meiosis. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 277: 201-226.

Bennett, M.D. 1977. The time and duration of meiosis. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 277: 201-226.

- Bensasson, D., Petrov, D.A., Zhang, D.X., Hartl, D.L. y Hewitt, G.M. 2001. Genomic gigantism: DNA loss is slow in mountain grasshoppers. *Mol. Biol. Evol.* 18: 246-253.
- Berner R.A., Vanden Brooks J.M. y Ward P.D. 2007. Oxygen and evolution. *Science* 316: 357-358.
- Bernhard, W. 1969. A new staining procedure for electron microscopical cytology. *J. Ultrastruct. Res.* 27: 250–265
- Boisvert, F.M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J. y Lamond A.I. 2007. The multifunctional nucleolus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 574-585.
- Bowman, J.L. 2013. Walkabout on the long branches of plant evolution. *Curr. Op. Plant Biol.* 16: 70–77.
- Burleigh, J.G., Barbazuk, W.B., Davis, J.M., Morse, A.M. y Soltis, P.S. 2011. Exploring Diversification and Genome Size Evolution in Extant Gymnosperms through Phylogenetic Synthesis. *Journal of Botany* ID 292857, 6 págs. doi:10.1155/2012/292857
- Docquier, S., Tillemans, V., Deltour, R. y Motte, P. 2004. Nuclear bodies and compartmentalization of pre-mRNA splicing factor in higher plants. *Chromosoma* 112: 255-266.
- Echeverría, O., Moreno Díaz de la Espina, Jiménez-García, L.F. y Vázquez-Nin, G.H. 1999. Supramolecular organization a chromocentric plant nucleus. *Biol. Cell.* 91: 209-219.
- Evans, G. M. y Rees, H. 1971. Mitotic cycles in dicotyledons and monocotyledons. *Nature* 233: 350-351.
- Fakan, S. 1994. Perichromatin fibrils are in situ forms of nascent transcripts. *Tren. Cell. Biol.* 4: 86-90.
- Fakan, S. y Bernhard, W. 1973. Nuclear labelling after prolonged ³H-uridina incorporation as visualized by high resolution autoradiography. *Exp. Cell Res.* 79: 431-444.
- Felsenfeld G. y Groudine M. 2003. Controlling the double helix. *Nature* 421: 448-453.

- Finet C., Timme R.E., Delwiche C.F. y Marlétaz F. 2012. Multigene phylogeny of the Green lineage reveals the origin and diversification of land plants. *Curr. Biol.* 22: 2217-2222.
- Friedman W.E. y Carmichael J.S. 1996. Double fertilization in gnetales: implications for understanding reproductiva diversification among seed plants. *Int. J. Plant. Sci.* 157 (6 Suppl.): S77-S94.
- Gandolfo, M.A., Nixon, K. y Crepet, W.L. 2004. Cretaceous flowers of Nymphaeaceae and implications for complex insect entrapment pollination mechanisms in early angiosperms. *PNAS* 101: 8056-8060.
- Gasser, S. 2002. Visualizing Chromatin Dynamics in Interphase Nuclei. *Science* 296: 1412-1416.
- Gregory, T.R. 2001. Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. *Biol. Rev.* 76: 65–101.
- Huang, S., Deerinck, J., Ellisman, M.H. y Spector, D.L. 1994. In vivo analysis of the stability and transport nuclear Poly(A)+RNA. *J. Cell. Biol.* 126: 877-899.
- Jiménez-García, L.F., Agredano-Moreno, L.T., Segura-Valdez, M. de L., Echeverría, O.M., Martínez, E., Ramos, C.H., Vázquez-Nin, G.H. 1992. The ultrastructural study of the interphase nucleus of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae:Triuridales) reveals a non-typical extranucleolar particle. *Biol. Cell* 75: 101–110.
- Jiménez-García, L.F., Reynoso-Robles, R., Fragoso-Soriano, R., Agredano-Moreno, L.T., Segura-Valdez, M. de L., González-Moreno, S., Ramos, C.H. y Martínez, E. 1998. Biología Celular de *Lacandonia schismatica*. Análisis por microscopia electrónica y de fuerza atómica. *Bol. Soc. Bot. Mex.* 62: 5-14
- Jiménez-García, L.F., Fragoso-Soriano, R., 2000. Atomic force microscopy of the cell nucleus. *J. Struct. Biol.* 129: 218–222.
- Jiménez-García, L.F., Segura-Valdez, M. de L., 2002. Visualizing nuclear structure in situ by atomic force microscopy. In: Braga, P.C., Ricci, D. (Eds.), *Atomic Force Microscopy: Methods and Protocols in Biomedical Applications*. Methods in Molecular Medicine, New Jersey.

- Jiménez-Ramírez, J., Agredano-Moreno, L.T., Segura-Valdez, M. de L. y Jiménez-García, L.F. 2002. *Lacandonia* granules are present in *Ginkgo biloba* cell nuclei. Biol. Cell 94: 511-518.
- Johnstone, R.W. 2002. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. Nat. Rev. Drug Discov. 1: 287-299.
- Kapraun, D.F. 2007. Nuclear DNA Content Estimates in Green Algal Lineages: Chlorophyta and Streptophyta. Ann. Bot. 99: 677–701.
- Kirik, A., Salomon, S. y Puchta, H. 2000. Species-specific double-strand break repair and genome evolution in plants. EMBO J. 19: 5562–5566
- Knighth, C., Molinari, N.A. y Petrov, D. 2005. The large genome constraint hypothesis: Evolution, Ecology and Phenotype. Ann. Bot. 95:177-190.
- Lafontaine, J.G., 1974. En: Busch, H. (Ed.). The Cell Nucleus. Academic Press, New York, pp. 149–185.
- Lamond, A.I, Earnshaw, W.C. 1998. Structure and function in the nucleus. Science 280: 547-53.
- Lamond, A.I. y Spector, L.D. 2003. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4: 605-612.
- Leitch, I.J., Chase, M.W. y Bennet, M. D. 1998. Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for small ancestral genome size in flowering plants. Ann. Bot. 82 (supplement A): 85-94.
- Leitch, I.J., Hanson, L., Winfield, M., Parker, J. y Bennett, M.D. 2001. Nuclear DNA C-values complete familial representation in gymnosperms. Ann. Bot. 88: 843-849.
- Leitch, I.J., Soltis, D.E., Soltis, P.S. y Bennett, M.D. 2005. Evolution of DNA amounts across land plants. Ann. Bot. 95: 201-217.
- Leitch, I.J., Beaulieu, Chase M.W., Leicht A.R. y Fay M.F. 2010. Genome size dynamics and evolution in monocots. Journal of Botany, id 862516, 18 págs.
- Lewin, B. 2008. Genes IX. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A de C.V. México. 892 págs.
- Ligrone, R., Duckett, J.G. y Renzaglia, K.S. 2012. Major transitions in the evolution of early land plants: a bryological perspective. Ann. Bot. 109: 851–871.

- López-Velázquez, G., Segura-Valdez, M. de L., Alcántara-Ortigoza, M.A. y Jiménez-García, L.F. 1998. Localization of intranuclear RNA by electron microscopy in situ hybridization using a genomic DNA probe. *Arch. Med. Res.* 29: 185-190.
- Luger, K. 2003. Structure and dynamic behavior of nucleosomes. *Curr. Op. Genet. Dev.* 13: 127-135.
- Manuelidis, L. 1990. A view of interphase chromosomes. *Science* 250: 1533-1540.
- Mao, Y.S., Zhang, B. y Spector, D.L. 2011. Biogenesis and function of nuclear bodies. *Tren. Gen.* 27: 295-306
- Marsden, M. y U.K. Laemmli, 1989. Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell* 17: 849-858.
- Midgley, J. J. y Bond, W.J. 1991. Angiosperms versus gymnosperms: a critical evaluation of the reproductive superiority hypothesis. *Biol. J. Linn. Soc.* 44: 81-92
- Mirkovich, J., Mirault, M.E. y Laemmli, U.K. 1984. Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell* 39: 223-232.
- Monneron, A. y Bernhard, W. 1969. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J. Ultrastruct. Res.* 27: 266-288.
- Moreno Díaz de la Espina S., Minguez A., Vázquez-Nin G.H. y Echeverría O.M. 1992. Fine structural organization of non-reticulate plant cell nucleus. An ultracytochemical and immunocytochemical study. *Chromosoma* 101: 311-321
- Nagl, W. 1985. Chromatin organization and the control of gene activity. *Inter. Rev. Cyt.* 94: 21-56.
- Narlikar, G. J., Fan H.Y. y Kingston, R. E. 2002. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108: 475-487.
- Olins D.E y A.L. Olins. 2003. Chromatin history: our view from bridge. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 809-814.
- Organ C. L., Canoville A., Reisz R.R. y Laurin L. 2011. Paleogenomic data suggest mammal-like genome size in the ancestral amniote and derived large genome size in amphibians. *Jour. Evol. Biol.* 24: 372-380.
- Pryer, K. M., Schuettelpelz, E., Wolf, P.G., Schneider, H. Smith, A.R., y Cranfill, R. 2004. Phylogeny and evolution of ferns (Monilophytes) with a focus on the early

- leptosporangiate divergences. *Amer. Jour. Bot.* 91: 1582-1598.
- Ramírez S. J. y Gómez E.C. 2003. Ácido desoxirribonucleico, DNA pp. 3-21. En Jiménez García L.F. y H. Merchant L. H. (coordinadores). 2003. *Biología Celular y Molecular*. Pearson Educación, México.
- Recillas T. F y Zurita O.M.E.2003. Control de la expresión genética de los eucariontes, pp. 63-101 . En Jiménez García L.F. y H. Merchant L. H. (coordinadores). 2003. *Biología Celular y Molecular*. Pearson Educación, México.
- Roth, J., 1986. Post-embedding cytochemistry with gold-labeled reagents. A review. *J. Microsc.* 143, 125–137.
- Saitoh, N., Spahr, C.S., Patterson, S.D., Bubulya, P., Neuwald, A.F. y Spector D.L. 2004. Proteomic analysis of interchromatin granule clusters. *Mol. Biol. Cell* 15: 3876-3890.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. second ed. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, vol. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 15-113.
- Singh, O.P., Björkroth, B., Masich, S., Wieslander, L. y Daneholt, B. 1999. The nuclear movement of Balbiani ring premessenger ribonucleoprotein particles. *Exp. Cell Res.* 251: 135-146.
- Soltis. 2003. Douglas E. Soltis, D.E., Soltis, P.S. Michael D. Bennett y Ilia J. Leitch. Evolution of genome size in the angiosperms. *Amer. Jour. Bot.* 90: 1596–1603.
- Soltis, D. E., Smith, S.A., Cellinese, N., Wurdack, K.J., Tank, D.C., Brockington, S.F., Refulio-Rodriguez, N.F., Walker, J.B., Moore, M.J., Carlswald, B.S., Bell, C.D., Latvis, M., Crawley, S., Black, C., Diaga Diouf, D., Xi, Z., Rushworth, C.A., Gitzendanner, M.A., Sytsma, K.J., Qiu, Y.L., Hilu, K.H., Davis, C.C., Sanderson, M.J, Beaman, R.S., Olmstead, R.G., Judd, W.S., Donoghue, M.J. y Soltis, P.S. 2011. Angiosperm phylogeny: 17 genes, 640 taxa 1. *Amer. Journ. Bot.* 98: 704–730
- Spector, D.L., Goldman, R.D., Leinwand, L.A. 1998. *Cells: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Thompson K.S y Muraszko K.1978. Estimation of cell size and DNA content in fossil fishes and amphibians. *Jour. Exp. Zool.* 205: 315-320

- Turner, B.M. y Franchi, L. 1997. Identification of protein and antigens associated with nuclear matrix and clusters of interchromatin granules in both interphase and mitotic cells. 1987. *J. Cell Sci.* 87: 269-282.
- Vázquez Nin G. H. y Bernhard. W. 1973. Comparative ultrastructural study of perichromatin and Balbiani ring granules. *J. Ultrastruct.* 36: 842-860.
- Vázquez Nin G.H., Echeverría M. O.M. y Jiménez-García L.F. 2003. El núcleo interfásico morfología y función. pp. 341-394. En Jiménez-García L.F. y Merchant L.H. (coordinadores). 2003. *Biología Celular y Molecular*. Pearson Educación, México.
- Vinogradov, A.E. 2003. Selfish DNA is maladaptive: evidence from the plant Rd List. *Tren. Gen.* 19: 609-614.
- Watson. 1962. Observations on a granule associated with chromatin in the nuclei of cells of rat and mouse. *J. Cell Biol.* 13, 162-167.

Original article

Lacandonia granules are present in *Ginkgo biloba* cell nuclei

Jaime Jiménez-Ramírez^a, Lourdes Teresa Agredano-Moreno^b,
María de Lourdes Segura-Valdez^b, Luis Felipe Jiménez-García^{b,*}

^a Herbarium, Department of Comparative Biology, Faculty of Sciences, UNAM, Mexico City 04510, Mexico

^b Laboratory of Electron Microscopy and Laboratory of Confocal Microscopy, Department of Cell Biology, Faculty of Sciences, UNAM, Mexico City 04510, Mexico

Received 2 May 2002; accepted 13 September 2002

Abstract

Lacandonia schismatica is a rare flowering plant with the sex organs spatially inverted. Several aspects of its cell biology are now known. Interestingly, within the cell nucleus, the chromatin is reticulated and it is associated to a novel structure named *Lacandonia* granules, a very abundant ribonucleoprotein particle showing similarities to perichromatin and Balbiani ring granules, which are involved in nuclear mRNA metabolism. To see whether these particles are present in other plants, we study the nucleus of *Ginkgo biloba*, a non-flowering plant. Light, electron and atomic force microscopy show that the cell nuclei of *G. biloba* are reticulated. Ultrastructural analysis showed that in the nucleoplasm, abundant intranuclear particles 32 nm in diameter are present. The EDTA regressive staining suggested that they contain RNA. Ultrastructural in situ hybridization confirmed the presence of RNA in these particles. Therefore, we conclude that the nuclei of *G. biloba* are reticulated and contain *Lacandonia* granules. We suggest that these particles may also be present in other plants.

© 2002 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: Cell nucleus; Chromatin; *Ginkgo biloba*; *Lacandonia schismatica*; *Lacandonia* granules; RNPs

1. Introduction

Within the mammalian cell nucleus, molecules involved in RNA metabolism are highly compartmentalized in very dynamic domains that are responsive to transcription and splicing, both in cultured cells (see Spector, 1993; Misteli, 2001) and also in cells present in several animal tissues (George-Téllez et al., 2002). On the other hand, in plants, the chromocentric and the reticulated nuclear types are recognized depending upon heterochromatin arrangement (Lafontaine, 1974; Jordan et al., 1980; Nagl, 1985; Moreno Díaz de la Espina et al., 1992; Echeverría et al., 1999).

Lacandonia schismatica is an endemic and rare plant (Diario Oficial, 1994) from the Selva Lacandona, Chiapas in Mexico, whose most prominent characteristic is the spatial

inversion of its sexual organs (Márquez-Guzmán et al., 1989; Martínez and Ramos, 1989). Recently, as part of an effort to understand its biology, we have been studying several aspects of its cell biology including the nuclear structure (Jiménez-García et al., 1992, 1998; Agredano-Moreno et al., 1994, 2001; Jiménez-García and Fragozo-Soriano, 2000; Agredano-Moreno and Jiménez-García, 2001). The cell nucleus of *L. schismatica* is reticulated and as reported, it is associated to a novel 32 nm diameter nuclear ribonucleoprotein (RNP) particle named *Lacandonia* granule. Interestingly, this nuclear arrangement is also displayed by very related plants such as *Triuris brevistylis* (Jiménez-García et al., 1992). Recent developmental, immunocytochemical and high resolution in situ hybridization results suggest that *Lacandonia* granules are nuclear particles similar to perichromatin and Balbiani ring granules present in mammalian and insect cells, respectively (Agredano-Moreno and Jiménez-García, 2000). Balbiani ring and perichromatin granules are nuclear RNP particles thought to be involved in intranuclear mRNA metabolism as storage and/or transport and also in the last steps of pre-mRNA processing (see Vázquez-Nin and Echeverría, 1996).

* Corresponding author. Departamento de Biología Celular Facultad de Ciencias, UNAM, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria México D.F. 04510, Mexico. Tel.: +52-5-6-22-48-27; fax: +52-5-6-22-48-28.

E-mail address: lfjg@hp.fciencias.unam.mx (L.F. Jiménez-García)

Here we have found that the nuclei of the tree *Ginkgo biloba*, a non-flowering plant, also contain *Lacandonia* granules associated to reticulated chromatin. The presence of these particles in such different plants suggests a basic function that needs to be explored.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Small fragments of young leaves from an adult tree of *Ginkgo biloba* were used for the present study.

2.2. Transmission electron microscopy

Sample preparation was conducted according to standard protocols. Briefly, small fragments of leaves were fixed for 1 h at room temperature in a mixture of 6% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde, buffered in PBS (pH 7.2). Post-fixation was done in 1% osmium tetroxide overnight. Samples were subsequently dehydrated in a graded series of ethanol and embedded in an epoxy resin (glycide ether 100, Merck). Thin sections of 60–90 nm thickness were contrasted with uranyl acetate and lead citrate. The number of *Lacandonia* granules per square micrometer was determined on X 40,000 electron micrographs. A total of five different nuclei were measured for each stage. Statistical analysis using Cochran's test was used.

2.3. Light microscopy

Semithin sections were stained with toluidine blue and pictures were taken in bright field with a Nikon E-800 light microscope equipped with a plan apochromatic 1.4 N.A. 100 X objective.

2.4. Atomic force microscopy

It was conducted on unstained epon embedded semithin sections as described (Jiménez-García and Fragoso-Soriano, 2000; Jiménez-García and Segura-Valdez, 2002).

2.5. EDTA regressive method for RNP

It was as originally described (Bernhard, 1969), with modifications for plants (Spector et al., 1998). Basically, uranyl acetate was used for 5 min, followed by a treatment with EDTA for 50 min and lead citrate for 2 min.

2.6. Immunoelectron microscopy

Fragments of leaves were fixed with a mixture of 0.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde for 1 h at room temperature. Lowicryl K4M was conducted as described (Roth, 1986). Thin sections of 60–90 nm were collected on

formvar coated gold grids. Grids were floated in Tris-buffered saline (TBS) containing 20 mM Tris (pH 7.6), 150 mM NaCl, 20 mM sodium azide, 1.0% Tween-20 and 10% bovine serum albumin (BSA), and 10% normal goat serum (NGS) for 60 min. The sections were then incubated in anti-DNA monoclonal antibody (Progen), diluted 1:30 in TBS at 4 °C for 16 h in a humidified chamber. As negative controls, some grids were floated on TBS with no primary antibody. Grids were washed for 15 min in TBS and then incubated with goat-anti-mouse IgM secondary antibody coupled to 10 nm colloidal gold particles (Jenssen), diluted 1:10 in TBS for 1 h at room temperature. After incubation, the grids were rinsed for 15 min in TBS and 10 min with water. Finally, the samples were stained with uranyl acetate and lead citrate.

2.7. Ultrastructural in situ hybridization

In situ hybridization to localize total RNA was performed as described (López-Velázquez et al., 1998; Agredano-Moreno and Jiménez-García, 2000) using genomic DNA as a probe, which was obtained from adult *G. biloba* leaves according to standard protocols (Sambrook et al., 1989).

3. Results

Condensed chromatin in *Ginkgo biloba* is reticulated: First, we were interested in defining the nuclear type present in *G. biloba*, by analyzing the distribution of chromatin. After light, standard transmission electron and atomic force microscopy, large strands within the cell nucleus were observed (Figs. 1 and 2). By using primary monoclonal antibodies recognizing DNA followed by 10 nm diameter colloidal gold coupled secondary antibodies, after immunoelectron microscopy, intense labeling was observed over these strands (Fig. 3). In this figure, the nucleolar organizer was also observed penetrating the nucleolus. On the other hand, no labeling was observed in the nucleoplasm or cytoplasm.

Lacandonia granules are present in *G. biloba* cell nuclei of leaves: With standard transmission electron microscopy (Figs. 2 and 5), abundant 32 nm in diameter particles were observed in the perichromatin and interchromatin space. As internal comparative structures, we showed the preribosomal particles in the nucleolus and ribosomes in the cytoplasm. After localization of RNA using *G. biloba* genomic DNA as a probe, we observed very intense labeling in the nucleoplasm (Figs. 4 and 6), in regions where *Lacandonia* granules are abundant. At higher magnification, *Lacandonia* granules were observed with standard transmission electron microscopy (Fig. 5a) or after the EDTA regressive staining for RNPs (Fig. 5b), a similar situation previously found in *L. schismatica* and *Triuris brevistylis*. The presence of RNA in *Lacandonia* granules was also observed after in situ hybridization using a *G. biloba* genomic DNA probe (Fig. 6). It is

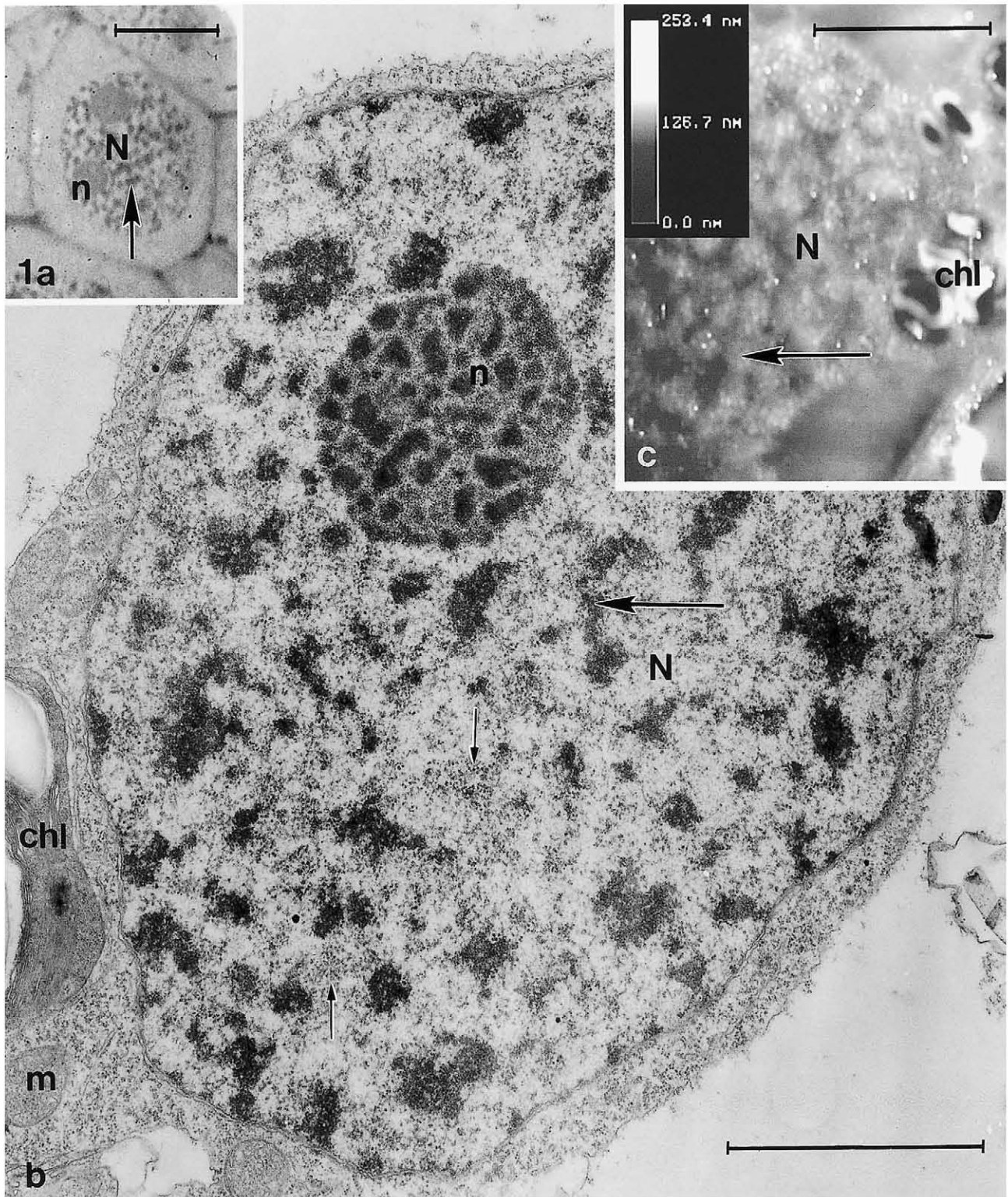


Fig. 1. Light (a), transmission electron (b) and atomic force (c) microscopy of the nucleus of *G. biloba*. Within interphase cell nuclei (N), chromatin (large arrows) is arranged as strands. (a) Light micrograph of a plastic-embedded semithin section after toluidine blue staining. (b) Electron micrograph after uranyl-acetate-lead citrate contrast. In the electron micrograph, a fibrogranular texture is seen (small arrows); n, nucleolus; chl, chloroplast; m, mitochondrion. (a) Bar is 10 μm; (b) bar is 3 μm; (c) bar is 5 μm.

interesting to note that the number of *Lacandonia* granules is increased in cells that turn on the transcription activity at the end of mitosis (Jiménez-García et al., in preparation).

Other RNP components were also observed as the fibers intermingled with *Lacandonia* granules (Figs. 2 and 5). In addition, nuclear ring-shaped bodies have also been observed

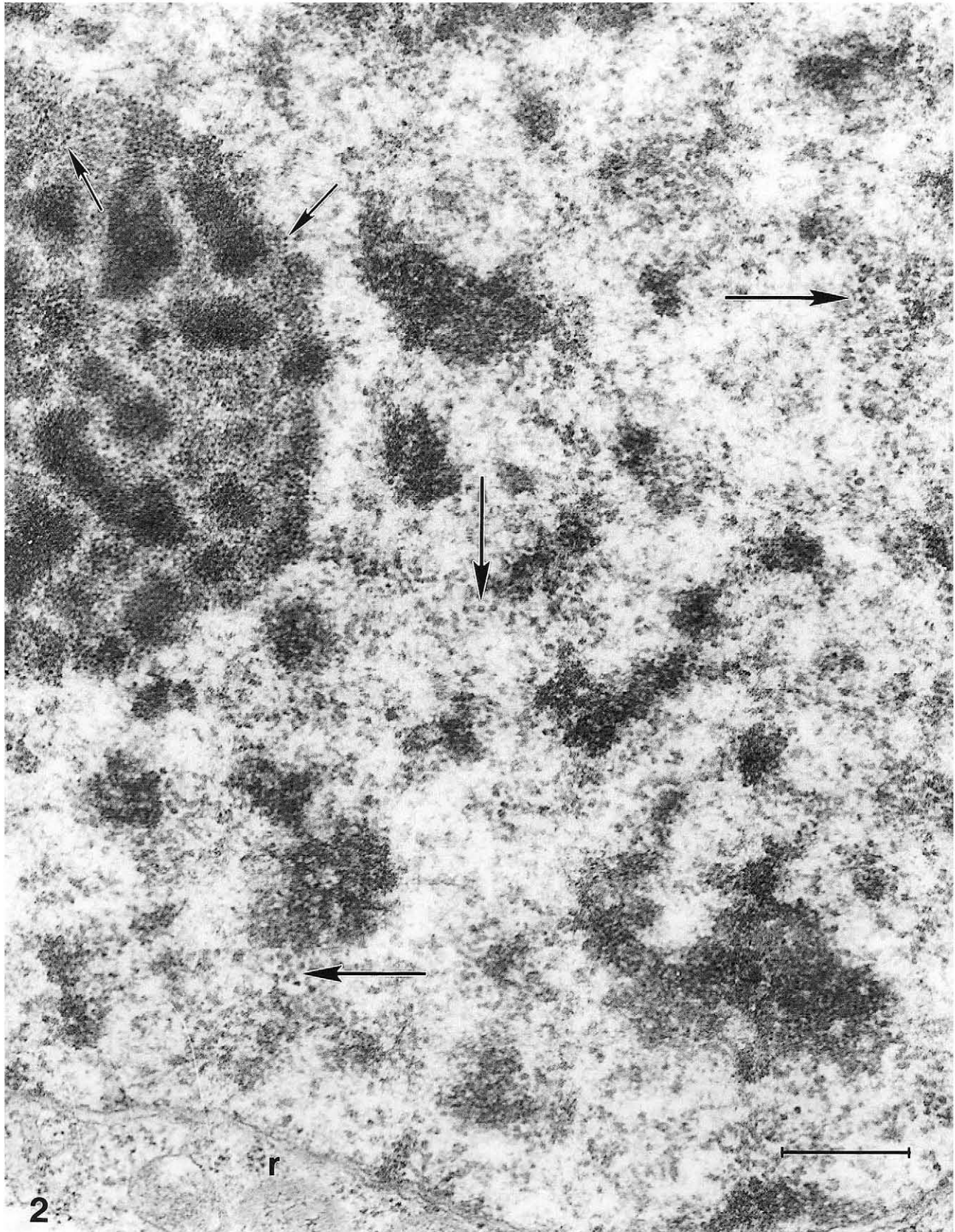


Fig. 2. Electron micrograph at high magnification of the nucleus of *G. biloba*. Within the nucleoplasm, abundant 32 nm diameter particles are observed (large arrows) associated with fibers. Other RNP particles as ribosomes (r) in the cytoplasm and preribosomes (small arrows) are shown for size comparison. Bar is 500 nm.

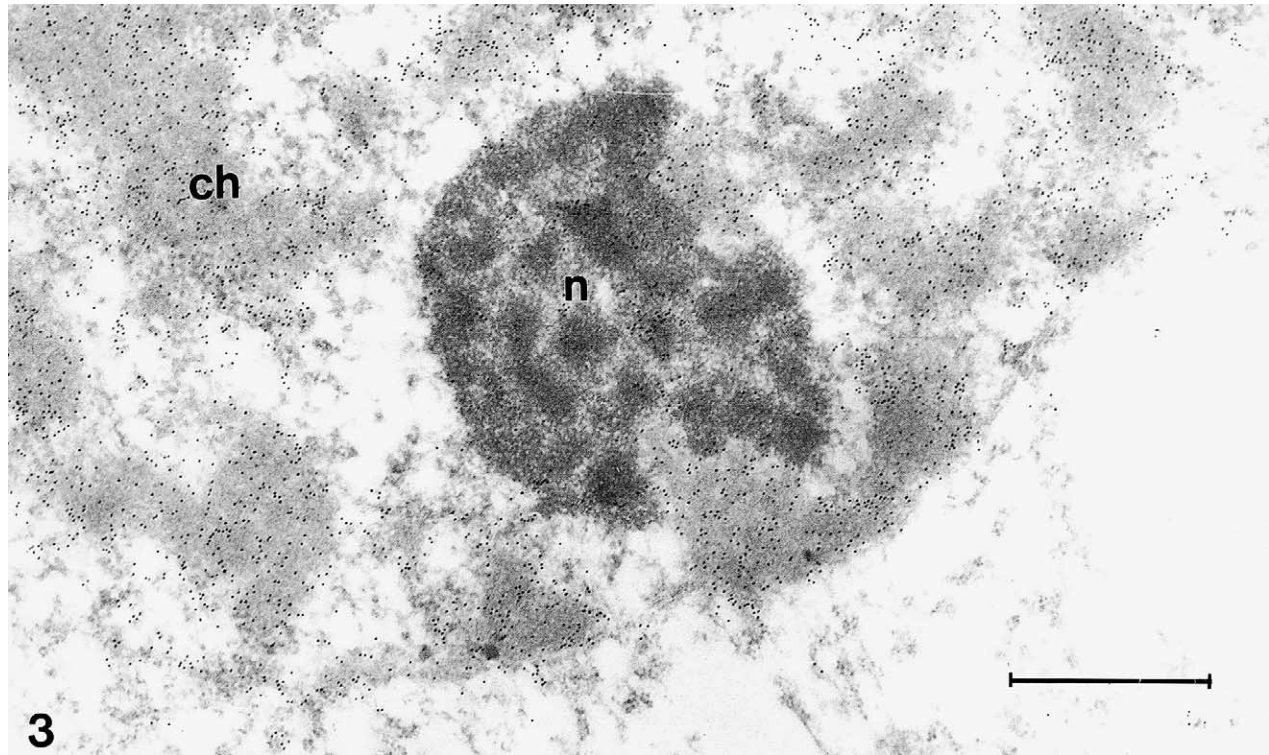


Fig. 3. Immunoelectron microscopic localization of DNA in the nucleus of *G. biloba*. Intense labeling is observed in the reticulated chromatin (ch) while in the nucleolus (n), it is almost absent. Uranyl acetate-lead citrate. Bar is 1 μ m.

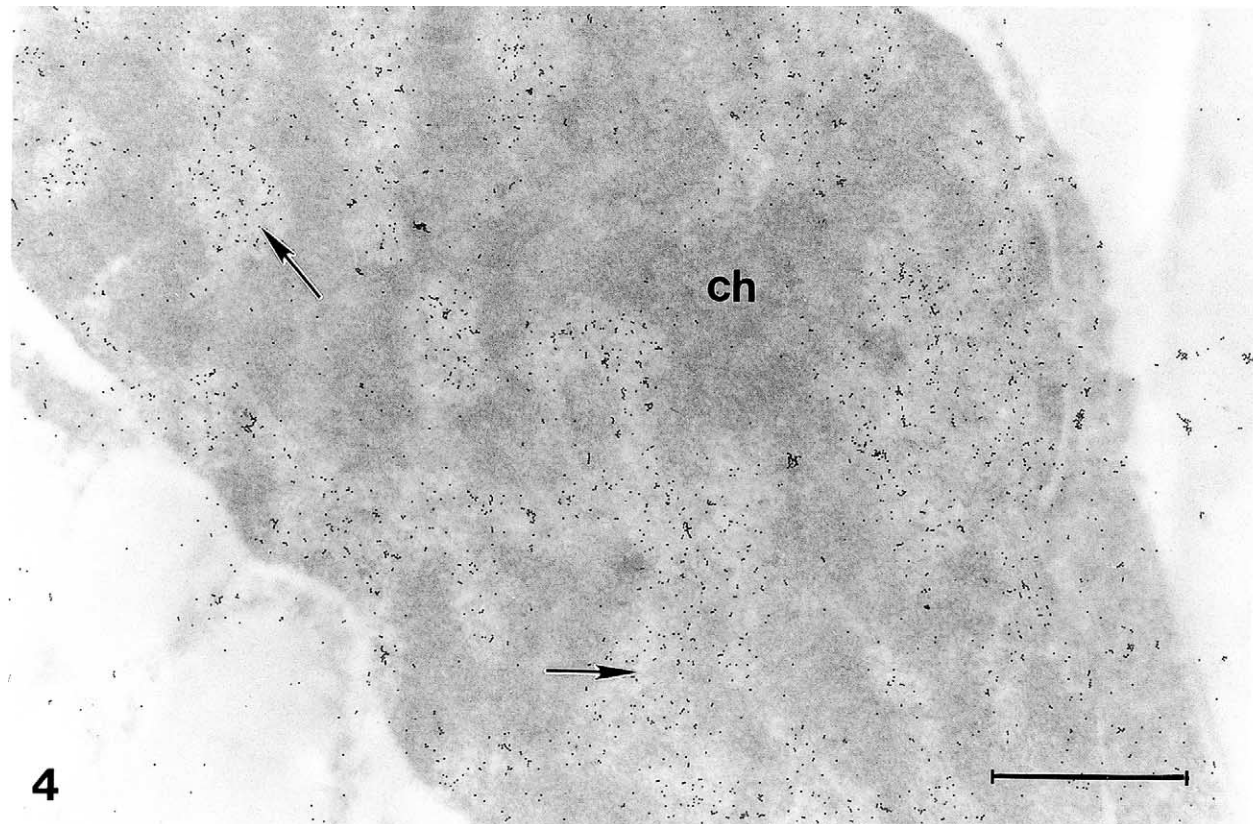


Fig. 4. Localization of RNA by ultrastructural in situ hybridization in the nucleus of *G. biloba*. Labeling is intense in the nucleoplasm (arrows) while in the chromatin (ch), it is very low. Uranyl acetate-lead citrate. Bar is 1 μ m.

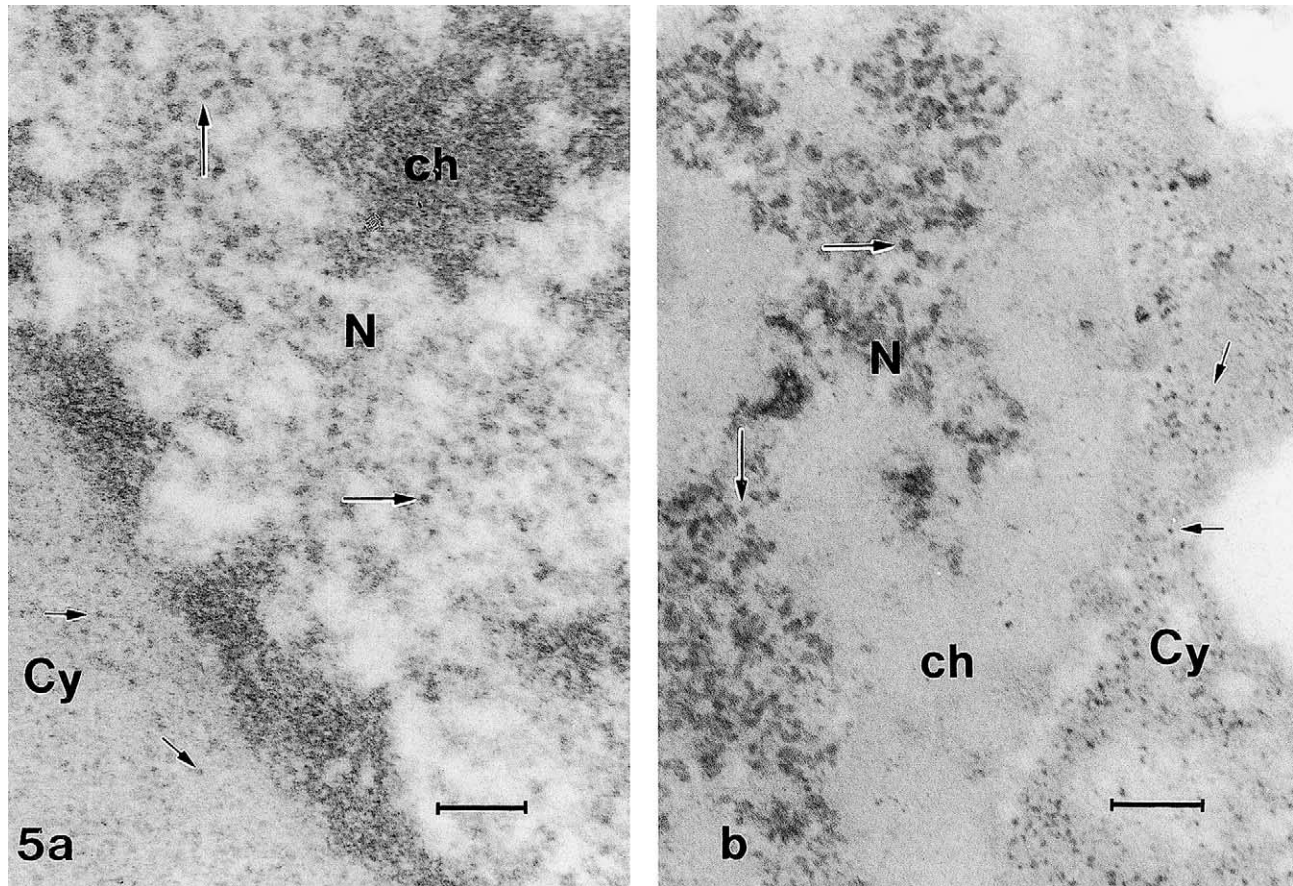


Fig. 5. Electron micrograph of a nucleus of *G. biloba* after uranyl acetate-lead citrate contrast (a) and EDTA regressive method (b) for RNPs. In both figures, *Lacandonia* granules are observed (large arrows) in the nucleus (N) associated with RNP fibers. Ribosomes (small arrows) are observed in the cytoplasm (Cy). Chromatin, ch. Bar is 200 nm.

in the nucleoplasm of *G. biloba* and other species (Agredano-Moreno et al., 2001). However, clusters of 15 nm diameter granules characterized by interchromatin granules clusters have not been observed so far.

4. Discussion

The nuclei of *G. biloba* are reticulated and contain *Lacandonia* granules. Three different criteria were used to confirm that *G. biloba* nuclei are reticulated. First, we used bright field microscopy of semithin sections after toluidine blue staining from epon embedding plant material. Within the cell nuclei, nucleoli and dark stained strands were observed. By electron microscopy after uranyl-lead contrast, large strands were also observed. These strands were also observed in unstained semithin sections by atomic force microscopy, as previously reported (Jiménez-García and Fragoso-Soriano, 2000). Ultrastructural confirmation that these strands correspond to chromatin came from results after immunoelectron localization of DNA and RNA. While intense labeling was detected in the nuclear strands after using anti-DNA antibodies, no labeling was detected after the detection of RNA by

using in situ hybridization with a genomic *G. biloba* DNA probe.

The reticulated organization of plant nuclei has been documented in several species such as *Allium cepa*, *A. porrum* (Lafontaine, 1974), *L. schismatica*, *T. brevistylis* (Jiménez-García et al., 1992), etc. Moreover, there are also data on the chromocentric arrangement of some species (Moreno Díaz de la Espina et al., 1992). Although a relation has been previously mentioned, it would be necessary to explore if the DNA amount influences the nuclear type (Nagl, 1985). In light of the present results, this matter would deserve a more detailed analysis.

We also provide three different kinds of evidence that *Lacandonia* granules are present in the nuclei of *G. biloba* leaves. First, by transmission electron microscopy, the intranuclear granules are 32 nm in diameter and they are mixed with RNP fibers. They are distributed in both the perichromatin and the interchromatin space. These characteristics have been previously reported (Jiménez-García et al., 1992). Second, we have shown that these particles are positive after the EDTA regressive technique preferential for RNPs. Third, these nuclear particles are labeled after the detection of RNA with a protocol using genomic DNA as a probe (López-

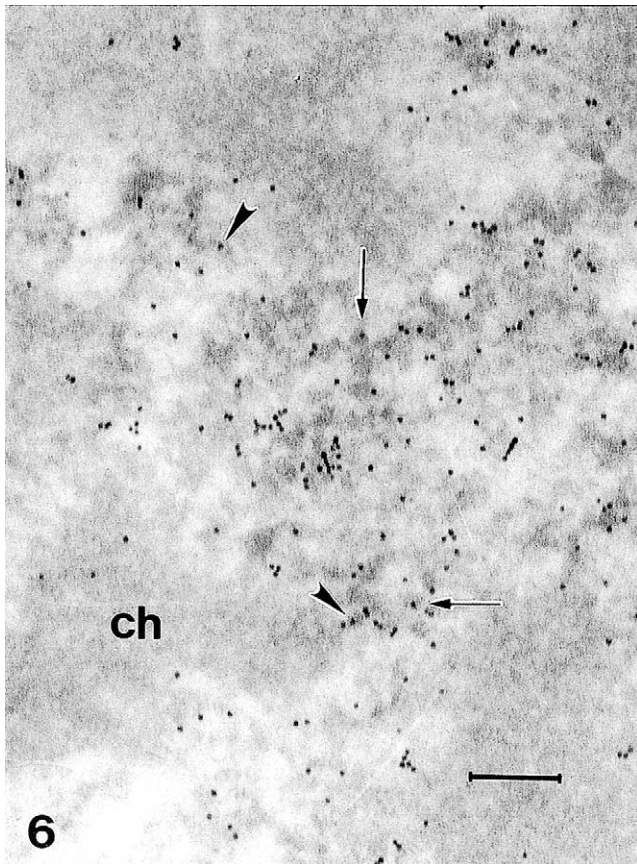


Fig. 6. Localization of RNA in *Lacandonia* granules in the nucleus of *G. biloba*. After in situ hybridization using total DNA as a probe and 10 nm colloidal gold particles as a marker, labeling is present in *Lacandonia* granules (arrows) and associated fibers (arrowheads). Uranyl acetate-lead citrate. Bar is 200 nm.

Velázquez et al., 1998; Agredano-Moreno and Jiménez-García, 2000).

It has been previously suggested that *Lacandonia* granules are intranuclear RNPs equivalent to perichromatin and Balbiani ring granules (Agredano-Moreno and Jiménez-García, 2000). Several evidences support this notion. They are labeled at the periphery with antibodies to snRNPs (Agredano-Moreno et al., 1994). In addition, the number of *Lacandonia* granules varies during flower development (Agredano-Moreno and Jiménez-García, 2000), similar to what occurs for perichromatin granules during development in animals (Vázquez-Nin and Echeverría, 1996). They also contain SR proteins as Balbiani ring granules. Nonetheless, the distribution of *Lacandonia* granules in both perichromatin and interchromatin space, the content of SR proteins and poly-A RNA also may suggest a similarity to interchromatin granule clusters, that has been shown to contain those components. However, the presence of numerous *Lacandonia* granules in the perichromatin region, where transcriptional activity takes place (Fakan, 1994), suggests a more close relation to perichromatin and Balbiani ring granules, since interchromatin granules are absent in this region.

Finally, based on light, electron and atomic force microscopy evidence, we conclude that the nuclei of *G. biloba* are reticulated. In addition, based on ultrastructural evidences such as size, distribution, and cytochemical results such as the EDTA technique for RNPs, in situ hybridization to detect total RNA, we conclude that *Lacandonia* granules are present not only in *Lacandonia schismatica* and *Triuris brevistylis* nuclei as previously reported (Jiménez-García et al., 1992), but also in the nuclei of the non-flowering plant *G. biloba*. We are currently testing the presence of these particles in other related plants.

Acknowledgements

Supported by CONACyT 28002-N and partially by DGAPA-UNAM IN-215999.

References

- Agredano-Moreno, L.T., Jiménez-García, L.F., Echeverría, O.M., Ramos, C.H., Martínez, E., Vázquez-Nin, G.H., 1994. Cytochemical and immunocytochemical study of nuclear structures of *Lacandonia schismatica*. *Biol. Cell* 82, 177–184.
- Agredano-Moreno, L.T., Jiménez-García, L.F., 2000. New evidence that *Lacandonia* granules are ultrastructurally related to perichromatin and Balbiani ring granules. *Biol. Cell* 92, 71–78.
- Agredano-Moreno, L.T., González-Jiménez, M.A., Segura-Valdez, M. de L., Ubaldo, E., Ramos, C.H., Martínez, E., Jiménez-García, L.F., 2001. Further ultrastructural characterization of the intranuclear ring-shaped bodies of the plant *Lacandonia schismatica*. *J. Struct. Biol.* 136, 1–6.
- Bernhard, W., 1969. A new staining procedure for electron microscopical cytology. *J. Ultrastruct. Res.* 27, 250–265.
- Diario Oficial de la Federación (Órgano del Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos). Tomo CDLXXXVIII Núm. 10. 1994. México.
- Echeverría, O., Moreno Díaz de la Espina, S., Jiménez-García, L.F., Vázquez-Nin, G.H., 1999. Supramolecular organization of a chromocentric plant nucleus. *Biol. Cell* 91, 209–219.
- Fakan, S., 1994. Perichromatin fibrils are in situ forms of nascent transcripts. *Trends Cell Biol.* 4, 86–90.
- George-Téllez, R., Segura-Valdez, M.L., González-Santos, L., Jiménez-García, L.F., 2002. Cellular organization of pre-mRNA splicing factors in several tissues. Changes in the uterus by hormone action. *Biol. Cell* 94, 99–108.
- Jiménez-García, L.F., Agredano-Moreno, L.T., Segura-Valdez, M. de L., Echeverría, O.M., Martínez, E., Ramos, C.H., Vázquez-Nin, G.H., 1992. The ultrastructural study of the interphase nucleus of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae:Triuridales) reveals a non-typical extranuclear particle. *Biol. Cell* 75, 101–110.
- Jiménez-García, L.F., Reynoso-Robles, R., Fragoso-Soriano, R., Agredano-Moreno, L.T., Segura-Valdez, M. de L., González-Moreno, S., Ramos, C.H., Martínez, E., 1998. Biología Celular de *Lacandonia schismatica*. Análisis por microscopía electrónica y de fuerza atómica. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 62, 5–14.
- Jiménez-García, L.F., Fragoso-Soriano, R., 2000. Atomic force microscopy of the cell nucleus. *J. Struct. Biol.* 129, 218–222.
- Jiménez-García, L.F., Segura-Valdez, M. de L., 2002. Visualizing nuclear structure in situ by atomic force microscopy. In: Braga, P.C., Ricci, D. (Eds.), *Atomic Force Microscopy: Methods and Protocols in Biomedical Applications*. Methods in Molecular Medicine, New Jersey (accepted).

- Jordan, E.G., Timmis, J.N., Trewavas, A.J., 1980. In: Tolbert, N.E. (Ed.), *The Biochemistry of Plants*. Academic Press, New York, pp. 489–588.
- Lafontaine, J.G., 1974. In: Busch, H. (Ed.), *The Cell Nucleus*. Academic Press, New York, pp. 149–185.
- López-Velázquez, G., Segura-Valdez, M. de L., Alcántara-Ortigoza, M.A., Jiménez-García, L.F., 1998. Localization of intranuclear RNA by electron microscopy in situ hybridization using a genomic DNA probe. *Arch. Med. Res.* 29, 185–190.
- Márquez-Guzmán, J., Engleman, E.M., Martínez-Mena, A., Martínez, E., Ramos, C.H., 1989. Anatomía reproductiva de *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). *Ann. Mo. Bot. Gard.* 76, 124–127.
- Martínez, E., Ramos, C.H., 1989. Lacandoniaceae (Triuridales): una nueva familia de México. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 76, 128–135.
- Misteli, T., 2001. Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expresión. *Science* 291, 843–847.
- Moreno Díaz de la Espina, S., Mínguez, A., Vázquez-Nin, G.H., Echeverría, O.M., 1992. Fine structural organization of a non-reticulated plant cell nucleus. An ultracytochemical and immunocytochemical study. *Chromosoma* 101, 311–321.
- Nagl, W., 1985. Chromatin organization and the control of gene activity. *Int. Rev. Cytol.* 94, 21–56.
- Roth, J., 1986. Post-embedding cytochemistry with gold-labeled reagents. A review. *J. Microsc.* 143, 125–137.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. second ed. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, vol. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 15.113.
- Spector, D.L., 1993. Macromolecular domains within the cell nucleus. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9, 265–315.
- Spector, D.L., Goldman, R.D., Leinwand, L.A., 1998. *Cells: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Vázquez-Nin, G.H., Echeverría, O.M., 1996. The polytene nucleus in morphological, cytochemical and functional studies of messenger RNA transcription, processing, and transportation. *Eur. J. Histochem.* 40, 7–16.